SÉRIE A, N° 3
N° D'ORDRE 1129

# THÈSES

PRÉSENTÉES

## A LA FACULTÉ DES SCIENCES
## DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

**LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE**
**(mention Sciences)**

PAR

Antoinette CHALVIGNAC

---

**1re THESE.** — CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA RHIZOSPHERE DU LIN

**2e THESE.** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

**Soutenues le** 7 Avril 1965 **devant la Commission d'examen.**

MM. CHOUARD ..... *Président.*

HELLER
ULRICH
POCHON
} *Examinateurs.*

SÉRIE A, N° 1105
N° D'ORDRE : 1129

# THÈSES

PRÉSENTÉES

## A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

**LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE**
**(mention Sciences)**

PAR

Antoinette CHALVIGNAC

---

**1re THESE.** — CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA RHIZOSPHERE DU LIN

**2e THESE.** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

**Soutenues le** 7 Avril 1965 **devant la Commission d'examen.**

MM. CHOUARD ..... *Président.*

HELLER
ULRICH
POCHON
} *Examinateurs.*

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

(Janvier 1965)

## FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

### - PROFESSEURS -

Doyen ... M. ZAMANSKY

| | | | |
|---|---|---|---|
| BRELOT | T analyse supérieure | CHAMPETIER | T chimie macromoléculaire |
| PRENANT | T anatomie et histologie comparée | CUVILLIER | T micropaléontologie |
| | | JUNG | T géologie |
| GRASSE | T évolution des êtres organisés | TRILLAT | T microscopie et diffrac. élec. |
| PREVOST | T chimie organique | WIEMANN | T chimie organ. et Structur. |
| WYART | T minéralo. et cristallo. | JACQUINOT | T spectroscopie et physique céleste (Orsay). |
| TEISSIER | T zoologie | | |
| MANGENOT | T biologie végét. (Orsay). | VASSY | T physique de l'atmosphère |
| AUGER | T physique quantique et relativité | DESTOUCHES | T théorie physique |
| | | AMIEL | T chimie générale |
| MONNIER | T physiologie générale | HOCART | T minéral. et cristal. |
| PIVETEAU | T paléontologie | J.P. MATHIEU | T physique optique |
| ROCARD | T physique ENS | COUTEAUX | T cytologie |
| CARTAN | T mathématiques ENS | MAY | T zoologie |
| LAFFITTE | T chimie générale | CHOQUET | T théorie des fonctions et topologie |
| N... | T géométrie supérieure | | |
| COULOMB | T physique du globe | FELDMANN | T biologie végétale marine |
| Mlle COUSIN | T biologie animale SPCN | GUINIER | T physique des solides (Orsay). |
| CHRETIEN | T chimie minérale | | |
| BOCQUET | T zoologie | JOST | T physiologie comparée |
| KASTLER | T physique ENS | FORTET | T calcul des probabilités et physique mathématiques |
| EPHRUSSI | T génétique | | |
| RIVIERE | T géologie SPCN et sédiment. (Orsay). | SCHWARTZ | T calcul dif. et intégral |
| | | CHOUARD | T physiologie végétale |
| GAUTHEREST | T biologie végétale PCB | MALAVARD | T aviation (technique aéron.) |
| LUCAS R. | T recherches physiques | NORMANT | T synthèse organique |
| THOMAS A. | T biologie cellulaire | BENARD | T chimie minérale |
| ARNULF | T optique appliquée | BUVAT | T botanique ENS |
| MORAND | T physique enseignement | DUGUE | T statistiques mathématiques |
| SOLEILLET | T physique PCB | SOULAIRAC | T psychophysiologie |
| FORTIER | T mécanique exp. des fluides | ULRICH | T physiologie végét. appliq. |
| DRACH | T zoologie | MARECHAL | T optique théor. et appliq. |
| QUENEY | T météo. et dynam. atmosp. | KIRRMANN | T théories chimiques |
| GALLIEN | T embryologie | CHADEFAUD | T botanique |
| EICHORN | T botanique | Mlle LE BRETON | T physio. de la nutrition |
| DE CUGNAC | T biologie végétale SPCN | LELONG | T appliq. de l'ana. à la géom. |
| Mlle CAUCHOIS | T chimie physique | DEVILLIERS | T anatomie et histo. compar. |
| THELLIER | T physique du globe | EHRESMANN | T topologie algébrique |
| L'HERITIER | T biologie générale (Orsay) | FRANCON | T physique SPCN |
| GRIVET | T radioélectricité (Orsay). | GLANGEAUD | T géogra. phys. et géol. |
| PONCIN | T mécanique générale | DODEMENT | T mathématiques MGP |
| DU BREIL | T arith. et théorie des nombres | PISOT | T technique math. de la physiq. |
| | | ROCH | T géologie |
| QUELET | T chimie organique | SCHTZMANN | T astrophysique |
| CAGNIARD | T géophysique appliquée | TERMIER | T géologie générale |
| | | ZAMANSKY | T mathématiques générales |

| | | | |
|---|---|---|---|
| LENNUIER | T physique MGP | LUCAS | T géologie |
| RIZET | T génétique (Orsay). | ALLARD | T chimie physique |
| ROUTHIER | T géologie appliquée | BERTHELOT | T physique des particules fondamentales (Orsay). |
| Mme TONNELAT | T physique théorique | | |
| DIXMIER | T mathématiques MPC | BRICARD | T météor. et physique de l'atm. |
| SOUCHAY | T chimie générale | Mme ALBE FESSARD | T psycho. physio. |
| AIGRAIN | T électrotechn. génér. | FRIEDEL | T physique des solides (Orsay). |
| BRUSSET | T chimie systématique | M. JULIA | T études des moléculaires complexes |
| M. LEVY | T physique théorique des hautes énergies (Orsay). | LENDER | T biologie animale SPCN (Orsay) |
| | | MAGAT | T physicochimie des radio-éléments |
| Mme CHAIX | T chimie biologique | | |
| Mme HUREL PY | T biologie végétale PCB | Mlle QUINTIN | T électrochimie |
| PANNETIER | T chimie générale | MONOD | T chimie du métabolisme |
| BRUN | T mécanique des fluides I | BENOIT | T physio. animale (Orsay). |
| LEDERER | T chimie biologique (Orsay). | DE POSSEL | T analyse numérique |
| Mme DUBREIL | T mathématiques (agréga). | CHARLOT | T chimie analytique |
| Mme LELONG | T math. II ENS | LEMEE | T écologie végétale (Orsay). |
| BELLAIR | T géologie SPCN | GUERIN | T chimie MPC (Orsay). |
| COTTE | T physique électricité | CHATELET | T chimie PCB |
| DUBOIS J.E. | T chimie organique | JEAN | T physio. nucléaire (Orsay). |
| LAMOTTE | T zoologie ENS | MATTLER | T physique SPCN |
| MICHEL A. | T chimie minérale (Orsay). | BERGERARD | T zoologie (Orsay). |
| OLMER | T énergétique générale | BERTEIN | T électronique (Orsay). |
| ROUAULT | T électricité (Orsay). | BOUISSIERES | T radiochimie |
| GAUTHIER | T mécanique appliquée | Mme COUTURE | T thermo. et méca. physique |
| BARCHEWITZ | T chimie physique | ELLEMBERGER | T géologie des grandes régions du globe (Orsay). |
| BROSSEL | T physique atomique | | |
| BUSER | T physiologie comparée | FRANC | T biologie animale PCB |
| CAMUS | T physio. végét. | SCHNELL | botanique tropicale |
| CASTAING | T physique II thermo.(Orsay) | STLKOWSKI | T physiologie végétale |
| CURIEN | T minéralo. et cristal. | ACHER | T chimie biologique |
| MOYSE | T physio. végét. (Orsay). | BAUDOIN | T biologie animale PCB |
| Mme CHARNIAUX-COTTON | T évolution des êtres organisés | BEAUMONT | biologie animale SPCN |
| | | BLAMONT | géophysique ionosphère |
| POSSOMPES | T zoologie | BOUREAU | T botanique |
| PULLMAN | T chimie quantique | CURIE D. | physique MGP |
| TEILLAC | T physique nucl. et radio-activité (Orsay). | DURAND DELGA | T géologie |
| | | FREON | T chimie organique (Orsay) |
| TONNELAT | T bio. physicochimie(Orsay) | HELLIER | T physiologie végétale |
| VILLE | T économétrie | TORTRAT | T calcul des probabilités |
| WILLEMART | T chimie PCB | CAILLEUX | T géologie SPCN |
| DODE | T chimie (Orsay). | MAGNAN | physique électricité |
| FREYMANN | T recherches physiques | DAUDEL | T mécanique ondulatoire appl. à la chimie théor. et à la physique nucléaire |
| GUINOCHET | T biolo. végét. SPCN (Orsay) | | |
| ROLLET | T chimie minérale | | |
| Mlle JOSIEN | T chimie SPCN | | |
| CHEVALLEY | T géométrie algébrique et théorie des groupes | Mlle FOURCROY | T biologie végétale SPCN |
| | | Mme CHOQUET BRUHAT | T mécanique analytique et mécanique céleste |
| ARNOULT | T électronique (Orsay). | | |
| CHAPELLE | T physique I (Orsay). | Mlle VEIL | T physiologie générale |
| DELANGE | T mathématiques I (Orsay). | LWOFF | T microbiologie |
| DENY | T mathém. génér. (Orsay). | SIESTRUNCK | T mécanique phys. et expérimentale |
| GERMAIN | T mécanique théorique des fluides | | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| LACOMBE | T métallurgie des métaux nucléaires (Orsay). | NERON | T math. MPC (Orsay). |
| BROCHARD | T physique PCB (Orsay). | Mme PECKER WIMEL | T astrophysique |
| CABANNES | T mécanique générale | BALKANSKY | physique MPC |
| LESIEUR | T math. I (Orsay). | LE CORRE | T électricité |
| MAZET | T mécan. génér. (Orsay). | DELCROIX | T physique théorique (Orsay). |
| CAIRE | géograp. physique et géograph. dynamique | GOURDIN | physique théorique des hautes énergies (Orsay). |
| COMOLET | T mécan. des fluides | LEHMANN | T physique expérim. des hautes énergies |
| CORABOEUF | T physio. animale (Orsay). | NATAF | T physique nucléaire et radioactivité (Orsay). |
| DELLOUE | T physique de l'exosphère | | |
| GORENFLOT | botanique II (Orsay) | ECHALIER | biologie animale PCB |
| HOUILLON | biologie animale PCB | BARRAUD | physiol. cellulaire |
| JULLIEN J. | chimie SPCN (Orsay). | LIORET | physiol. végét. (Orsay). |
| MALGRANGE | T technique math. de la phys. Ors. | DARS | géologie structurale et géologie appliqué |
| OLIVIER | antropologie | CAMEFORT | T botanique (agréga). |
| NOZERAN | T botanique II (Orsay). | VICHNIEWSKY | T mécanique industrielle |
| BLANC-LAPIERRE | T physique ENS (Orsay). | BLAQUIERE | électronique (Orsay). |
| CHEVAUGEON | T botanique (Orsay). | ARNOUS | T physique théorique |
| KAHANE | T mathématiques (Orsay). | TATIBOUET | chimie CSU (Orléans). |
| SAMUEL | T math. ENS féminines | MALLIAVIN | T math. propé. (Orsay). |
| KOURGANOFF | T astronomie (Orsay). | GAUDEMAR | chimie propé. |
| THIRY | T mécan. céleste | PEREZ Y JORBA | physique exp. des hautes énergies (Orsay). |
| ABELES | physique SPCN | | |
| AMAT | T physique PCB | DAVID | T chimie (agréga) (Orsay). |
| AUBOIN | T géologie | BROUSSE | T mécanique théorique |
| Mme BENOIT-GUEUTAL | T physique nucléaire et radioactivité (Orsay). | ROSCH | T astronomie |
| | | GUY | T physique expérimentale |
| BOUGIS | biologie marine (Villefranche-sur-Mer) | LAZARD | math. MPC |
| | | MOREL P. | physique MPC |
| BRUHAT | T math. MPC | ARSAC | programmation |
| BRUNN | T géologie historique(Orsay) | LEFEBVRE | chimie MPC |
| CHABBAL | T physique MGP (Orsay). | CHAPEVILLE | biochimie |
| DEHEUVELS | T math. propé. | BENOIT | physique CPEM |
| D'ESPAGNAT | T physique théorique (Orsay) | RIO | chimie CPEM |
| FURON | T géologie SPCN | JAUZEIN | géologie ENS |
| Mme GANS | T génétique | PREVOST G. | BV CPEM |
| GENEVES | T biologie végétale PCB | FAVARD P. | BA CPEM |
| GUILBERT | physique CUS (Orléans) | VILKAS | chimie CPEM |
| HUPE | pétrographie | Mlle FICINI | chimie CPEM |
| HOLLANDE | T biolo. génér. | LEQUEUX | astronomie |
| LIONS | T analyse numérique | COHEN TANNOUDJI | physique MPC |
| MAITTE | T chimie PCB | TAVERNIER | physique CPEM |
| MEYER | physique propé. | Mme ROIZEN | physique CPEM |
| NICOLAS | géologie appliquée | DURAND M. | BA SPCN |
| PANIGEL | biologie générale | PASCAUD | physiologie |
| RAVIER | pétrographie | Mme PETIT | BA CPEM |
| ROSEAU | mécan. théor. des fluides | BROUSSE | géologie (Orsay). |
| ROUBINE | T électronique | CAGNIAC | physique (agréga) (Orsay). |
| SILBER | T chimie PCB | LEBERRE | zoologie (Orsay). |
| UEBERSFELD | T électronique | SCHEFFER | microbiologie (Orsay). |
| YVON | T théories physiques | DE GENNES | physique des solides (Orsay). |
| HERVE | T mathématiques | RIOU | physique nuclé. exp. (Orsay). |
| | | CLAUSER | chimie biolo. (Orsay). |
| | | CHEVALLER | physio. animale (Orsay). |

| | |
|---|---|
| JANCOVICI | physique atomique (Orsay). |
| FALK-VAIRANT | physique nucléaire (Orsay). |
| FETIZON | chimie propé. (Orsay). |
| CERF | mathématiques (Orsay). |

Le Secrétaire Général : R. POULLAIN.

# CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA RHIZOSPHERE DU LIN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544307_0039

SOMMAIRE

INTRODUCTION ..... 1

Première Partie

ETUDE MICROBIOLOGIQUE DE LA RHIZOSPHERE DU LIN EN CONDITIONS NATURELLES, A DIVERS STADES DE CROISSANCE

Chapitre I : Culture du Lin - Prélèvements ..... 6
Chapitre II : Techniques microbiologiques ..... 9
Chapitre III : Etude de l'effet rhizosphère sur la microflore totale et les différents groupes fonctionnels bactériens .... 24

Deuxième Partie

ETUDE MICROBIOLOGIQUE DE LA RHIZOSPHERE DU LIN EN CULTURE HYDROPONIQUE

Chapitre IV : Techniques microbiologiques en culture hydroponique 48
Chapitre V : Aspects morpho-physiologiques de la rhizosphère du Lin ..... 60

Troisième Partie

ETUDE BIOCHIMIQUE ET ACTION DES EXSUDATS RADICELLAIRES SUR LES INTERRELATIONS MICROBIENNES DANS LA RHIZOSPHERE

Chapitre VI : Etude biochimique des excrétions radicellaires du Lin ..... 85
Chapitre VII : Action des exsudats radicellaires et de certains filtrats bactériens dans l'équilibre microbien de la rhizosphère ..... 100

CONCLUSIONS GENERALES ..... 111

# INTRODUCTION

Pendant de longues années, les racines furent considérées uniquement comme des organes de fixation et d'absorption des éléments minéraux du sol.

Au début du siècle, les premières études microbiologiques devaient modifier cette conception. Les plantes ne sont pas en contact direct avec les éléments du sol, mais par l'intermédiaire d'une "enveloppe" bactérienne plus ou moins importante, recouvrant les racines. Ainsi fut-il envisagé, que les microorganismes pourraient jouer un rôle sur la vie et la santé des plantes.

En 1904, HILTNER appelle "rhizosphère", la zone de contact entre le sol et les racines et, le premier, il prouve que la plante peut exercer des effets significatifs sur le nombre et l'activité des microorganismes adjacents aux racines.

De grands pas furent faits dans ce sens, et plusieurs monographies sont consacrées à ces études : STARKEY (1939-1958) ; KATZNELSON et coll. (1948) ; CLARK (1949) ; LOCHHEAD (1958) ; KRASSILNIKOV (1958).

Ajourd'hui le terme "rhizosphère" a pris un sens plus large. Il désigne la portion de sol soumise aux influences des racines, les dimensions de celle-ci dépendant de la plante et du sol. Dans cette zone, les interactions entre les plantes et les microorganismes modifient profondément l'équilibre quantitatif et qualitatif de la microflore, c'est "l'effet rhizosphère". Maximum à la surface des racines et dans le sol à leur contact, il diminue considérablement dès que la zone considérée est plus éloignée des racines.

La surface des graines, portant sa microflore propre, semble un centre important d'interactions, auquel on tend actuellement à attacher aussi beaucoup d'intérêt, VERONA (1958) lui a donné le nom de Spermosphère.

"L'effet rhizosphère" est donc la résultante de deux phénomènes bien distincts réagissant l'un sur l'autre : la plante avec ses sécrétions d'une part, le sol avec sa microflore d'autre part. Ainsi, deux voies de recherches se trouvent ouvertes : celle où l'on étudie l'action de la plante sur la microflore, et celle où l'on étudie l'action de la microflore sur la plante.

A) Action de la plante sur la microflore.

C'est sans nul doute ce type de recherche qui a suscité initialement le plus d'intérêt.

L'activité des racines durant la croissance de la plante peut être considérée comme le facteur principal de "l'effet rhizosphère".

Dès le début des recherches, on pensa que la libération par les racines de substances facilement métabolisables représentait autant de sources d'énergie et de nutrition supplémentaires pour les microorganismes de la

rhizosphère. Avec l'évolution des techniques et, surtout, l'apparition des méthodes chromatographiques et biochimiques, un grand nombre de composés organiques ont, de fait, été mis en évidence dans les extraits radicellaires de plantes cultivées stérilement. Une récente revue bibliographique de ROVIRA (1962) fait le point de cette question.

Plus indirectement, les racines peuvent encore agir sur l'équilibre microbien en créant un ensemble de conditions qui modifient la structure physique et chimique du sol. Au cours de la croissance, elles y puisent des sels minéraux, de l'eau et, par leur respiration, elles absorbent l'oxygène et rejettent du gaz carbonique. Il s'ensuit une perturbation de l'équilibre ionique par solubilisation de certains ions et insolubilisation d'autres (GERRETSEN, 1948 ; GORING et CLARK, 1948 ; FRIES and FORSMANN, 1951).

De toutes ces études, il ressort que la rhizosphère représente pour les microorganismes un milieu très différent de celui du sol, entraînant des modifications qualitatives et quantitatives maintes fois vérifiées sur de nombreuses plantes.

B) Action de la microflore sur la plante.

L'accumulation extraordinaire de microorganismes particulièrement actifs, sur les racines et à leur voisinage ne peut être sans effet sur la croissance de la plante.

En dehors de l'étude des bactéries symbiotiques et pathogènes, ce domaine reste obscur, bien que le plus grand intérêt y soit actuellement porté d'un point de vue à la fois théorique et pratique.

FRED et HAAS (1919) ont montré que la présence de bactéries sur les racines amplifie l'effet de solubilisation du calcium. Il en est de même pour le phosphore dont l'absorption par la plante est beaucoup plus élevée en culture non stérile qu'en culture stérile (GERRETSEN, 1948).

Le rôle des bactéries dans la nutrition végétale est encore mal connu, mais il est probable que plusieurs groupes de composés organiques (sucres, amino-acides, etc.) synthétisés par elles, sont absorbés par les plantes (HARMSEN et coll., 1955 ; KRASSILNIKOV, 1958).

Plus étudiés sont les effets stimulants de certains métabolites microbiens telles les auxines (VANCURA et MACURA, 1961), ou des effets dépressifs, par élaboration de toxines ou substances antibiotiques.

Enfin, il ne faut pas oublier l'établissement de certains "états pathogènes" provoqués par des phénomènes de compétitions ou d'antagonismes microbiens.

Ces informations apportées par l'étude des réactions d'espèces végétales variées, avec des techniques souvent très différentes, sont difficiles à comparer. Si "l'effet rhizosphère" est un fait certain, nous sommes moins bien renseignés sur l'enchaînement de tous les phénomènes qui en sont responsables.

Il est donc important, pour mesurer "l'effet rhizosphère" de possèder .e méthodologie qui permette d'apprécier l'évolution de la microflore durant toute la croissance d'une plante. Le but de notre travail a été d'adapter un certain nombre de techniques, afin de suivre, dans des conditions déterminées, certains aspects de la biologie de la rhizosphère d'une plante donnée, puis, d'en analyser et d'en dégager les principaux facteurs. Pour cette étude, nous avons choisi le Lin dont la culture peut etre aisément réalisée au laboratoire et à la lumière du jour, à condition toutefois que celle-ci soit pratiquée entre Mai et Juillet.

De plus, en dehors des quelques études succintes de TIMONIN (1940), WEST et LOCHHEAD (1940) et un travail plus complet de BEREZOVA (1946), WALLACE et LOCHHEAD (1949), cette plante a jusqu'ici suscité peu de recherches microbiologiques ; l'intérêt s'est centré surtout sur les infestations cryptogamiques qui affectent très fréquemment les cultures linières. C'est pourquoi, nous n'envisageons pas ici, l'influence des champignons dans la rhizosphère, qui, à elle seule pourrait faire l'objet d'une importante étude.

Pour étudier "l'effet rhizosphère" du Lin, nous avons adopté la méthodologie de J. POCHON mise au point au Service de Microbiologie du Sol de l'Institut Pasteur. Elle permet d'établir un ensemble de comparaisons sur l'activité des groupements fonctionnels dans la rhizosphère et dans le sol témoin au cours des stades successifs de la croissance du végétal.

"L'effet rhizosphère" résultant d'un ensemble de relations très complexes, il était intéressant de chercher à reproduire ce phénomène dans des conditions contrôlées et d'en éliminer les facteurs accessoires, c'est-à-dire provoquer un "effet rhizosphère" dépendant uniquement de la plante et de l'ensemble de la microflore. Précisons que ces recherches ont été conduites durant les premiers stades de croissance, notre installation technique ne permettant pas d'obtenir des plantules âgées de plus d'un mois et demi.

Le but de notre travail a été entre autre :

1) D'étudier "l'effet rhizosphère" sur le Lin, tel qu'il se produit dans des conditions naturelles de culture en champ et en pot à la serre.

2) D'étudier "l'effet rhizosphère" établi dans les conditions définies permises par les cultures hydroponiques et de le comparer à celui obtenu à l'état naturel.

3) D'étudier la répartition des bactéries de la rhizosphère non seulement d'un point de vue systématique mais en liaison avec leurs propriétés physiologiques (pouvoir de synthèse, taux de croissance).

4) D'étudier les excrétions radicellaires tant du point de vue de leur composition qualitative que de leurs effets sur la croissance de diverses bactéries et d'en retirer, à partir des données ainsi recueillies, des indications sur le mécanisme de "l'effet rhizosphère" et sur l'importance relative des divers facteurs qui y participent.

Le présent travail a été effectué à l'Institut Pasteur, dans le Service de Microbiologie du Sol.

Nous tenons tout d'abord à remercier Monsieur le Docteur POCHON, Chef de ce Service. Nous faisant profiter de ses vastes connaissances depuis de longues années, c'est avec une extrême bienveillance qu'il nous a guidé dans nos recherches, qu'il trouve ici, l'expression de notre profonde et respectueuse reconnaissance.

Qu'il nous soit permis d'exprimer des remerciements très chaleureux à Monsieur le Professeur CHOUARD qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Notre très profonde gratitude va à Monsieur le Professeur HELLER, notre rapporteur. Avec bienveillance, il nous a aidé de ses conseils et a dirigé la rédaction de notre travail.

Nous remercions très vivement Monsieur le Professeur ULRICH d'avoir, par ses remarques éclairées, contribué à l'amélioration de ce texte.

Nous exprimons notre respectueuse reconnaissance à Monsieur le Professeur GERNEZ-RIEUX, Directeur de l'Institut Pasteur, à Monsieur le Professeur TREFOUEL, Directeur Honoraire, ainsi qu'à Monsieur le Docteur MARNEFFE, sous-Directeur, d'avoir facilité la réalisation de ce manuscrit.

Que Monsieur le Docteur PREVOT veuille bien agréer l'expression de notre gratitude pour son aide précieuse lors de la détermination, parfois laborieuse, de certaines souches bactériennes.

Nous devons de très vifs remerciements à Monsieur le Docteur BESCOL-LIVERSAC, Maître de Recherches, pour nous avoir grandement aidé dans l'édition de ce manuscrit.

Nous remercions encore tous nos collègues du Service de Microbiologie du Sol ainsi que le personnel technique, particulièrement Mesdames MADELAINE et RODDE, auprès desquelles nous avons trouvé une aide empressée.

# PREMIERE PARTIE

## ETUDE MICROBIOLOGIQUE DE LA RHIZOSPHERE DU LIN EN CONDITIONS NATURELLES ET A DIVERS STADES DE CROISSANCE

Dans cette première partie, nous envisageons "l'effet rhizosphère" du Lin observé dans des conditions naturelles de culture, c'est-à-dire, en présence de sol, d'une part dans les champs, et d'autre part, en pot à la serre à température et humidité constantes.

Le premier chapitre est consacré au mode de culture et aux méthodes de prélèvements.

Le deuxième chapitre passe en revue les principales techniques microbiologiques utilisées pour étudier les divers aspects de la rhizosphère, puis, décrit plus spécialement celles que nous avons adoptées.

Dans le troisième chapitre, après un bref rappel des résultats généraux déjà obtenus par différents auteurs, nous exposons les nôtres portant sur l'étude de "l'effet rhizosphère" du Lin, en relation avec la microflore totale et les principaux groupes fonctionnels du cycle de l'Azote et du Carbone, aux divers stades de croissance de la plante.

Nous terminons cette première partie par une courte conclusion sur l'ensemble de nos résultats.

Chapitre I

# CULTURE DU LIN - PRELEVEMENTS

## 1. REALISATION DES SEMIS

### A. CHOIX DES GRAINES.

Linum usitatissimum variété Pervenche, sélectionné d'une lignée du type Malabrigo provenant d'Amérique du Sud, et jamais traité par des substances anticryptogamiques, a été utilisé. Sa principale caractéristique en est sa résistance à la "fatigue" des sols, plus spécialement à certaines maladies cryptogamiques telle que Polyspora, une des plus répandues dans le bassin Parisien.

Avant toute expérience, il est nécessaire de s'assurer du pouvoir germinatif des graines : dans le fond de cinq boîtes de Pétri garnies d'un papier filtre humide, on dépose 20 graines dans chacune d'elles. Après 5 jours d'étuve à 28°, la proportion des graines germées doit être de l'ordre de 95 à 100 %.

### B. CULTURE EN CHAMP.

Les expériences ont été conduites à la Station Agronomique de Versailles. Le semis a été réalisé mi-Avril, à raison de 150 kg de graines par hectare, la culture de Lin exigeant des semis très serrés. A cette densité, les plantes ne s'étiolent pas et la résistance à la verse s'en trouve augmentée. Le sol est un limon argilo-sableux à pH 6,6.

La même terre, conservée dans un pot enfoncé dans le sol, a échappé aux racines et a servi de témoin.

### C. CULTURE EN POTS.

On utilise des pots de jardinier de 14 cm de diamètre, bien lavés. Chacun d'eux contient 1 kg de terre de jardin à pH 7,5 grossièrement tamisée. 25 graines de Lin y sont semées. On arrose jusqu'à écoulement dans la coupelle placée sous le pot. Les différents pots sont ensuite pesés.

Pour maintenir une humidité constante durant la croissance du Lin, on vérifie tous les deux jours le poids des pots et l'on arrose s'il y a eu perte d'eau. Les pots sans graines constituant le témoin, sont traités de la même manière.

Les cultures sont réalisées à la serre. L'éclairement est celui du rayonnement solaire.

## 2. LES PRELEVEMENTS

### A. DATES DES PRELEVEMENTS.

Physiologiquement, le cycle végétatif du Lin comprend deux grandes périodes. La première va de la germination à la floraison, le photopériodisme y joue un rôle capital. La deuxième s'étend de la floraison à la maturité, les conditions thermiques y deviennent prépondérantes. Les prélèvements ont donc été pratiqués : à la germination, 20 jours après la germination, à la floraison et à la fructification.

### B. LIEU DES PRELEVEMENTS.

Il est ici important de préciser les limites de l'effet rhizosphère. L'intensité de celui-ci, maximum au contact des racines, diminue quand la distance augmente, pour devenir nul à une distance variant de 10 à 50 cm des racines suivant l'espèce végétale.

Ainsi, selon le site du prélèvement, on s'adressera soit à la rhizosphère proche ou rhizoplan (au contact des racines), soit à la rhizosphère éloignée ou édaphosphère (à distance des racines).

Seule, la rhizosphère proche sera étudiée dans ce travail.

### C. METHODES DE PRELEVEMENTS.

Les méthodes de prélèvements du rhizoplan varient suivant les auteurs. Pour les uns (TIMONIN, 1940 ; LOCHHEAD, 1940), l'ensemble du système radicellaire est précautionneusement dégagé de la motte de terre, secoué pour éliminer les particules de terre adhérentes aux racines, puis lavé dans un volume d'eau déterminé ; c'est cette eau de lavage qui sera soumise à l'analyse. D'autres auteurs (CLARK, 1949) utilisent la terre adhérente aux racines, obtenue par secouage et brossage de celles-ci. Enfin, TEPPER (1949), FEDOROV (1951) se servent du broyat des racines avec la terre adhérente.

Aucune de ces méthodes ne nous a paru satisfaisante. La première ne permet pas d'évaluer, même grossièrement, la quantité de terre contenue dans le volume d'eau, sans une mesure préalable. Durant le temps nécessaire à cette mesure, l'échantillon doit être conservé à la glacière. Or, GOLEBIOWSKA et coll. (1957) ont signalé la nécessité d'utiliser les échantillons de terre fraîchement prélevés.

Dans la seconde méthode, le simple brossage ne suffit pas à détacher les microorganismes fortement fixés aux poils absorbants en particulier.

Quant à la troisième méthode, elle nous semble complètement à rejeter car les racines, lors de leur broyage, abandonnent dans le milieu une quantité de substances suffisantes pour modifier la composition du milieu de culture utilisé pour l'analyse, tout au moins aux premières dilutions d'ensemencement.

L'association des deux premières méthodes nous a semblé pouvoir surmonter les inconvénients de chacune d'elles, sans toutefois parvenir à des conditions pleinement reproductibles.

Nous avons cherché à toujours effectuer les prélèvements sous des conditions d'humidité du sol sensiblement identiques, à utiliser un poids de terre de même ordre de grandeur et à recueillir la plus grande proportion possible de la flore microbienne la plus sensible à l'action des exsudats radicellaires, c'est-à-dire, celle des particules de terre attachées aux racines et celle retenue par les poils absorbants.

Nous avons adopté la technique de RIVIERE (1959) en y ajoutant un brossage des racines pour détacher les particules de terre :

Après avoir été écartées soigneusement de la motte de terre environnante, les racines sont secouées afin de ne conserver sur elles que les particules les plus fortement adhérentes ; ces dernières en sont détachées par un brossage vigoureux et recueillies. Les racines sont lavées pendant 10 minutes dans de l'eau stérile. On agite de temps en temps le récipient puis, on les retire en les égouttant bien. Un poids connu de terre provenant du brossage est ajouté à cette eau, dans le rapport de 1 g de terre pour 9 ml d'eau de lavage. Le mélange, broyé au mortier constitue la première dilution-suspension de terre rhizosphère (au 1/10).

Pour le prélèvement de la terre témoin, on mélange le plus intimement possible la terre de 2 pots, que l'on tamise pour éliminer cailloux et grosses particules. On prélève une certaine quantité de cette terre que l'on broye au mortier avec la quantité d'eau correspondante à une dilution au 1/10.

Chapitre II

# TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES

## 1. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

La mise en évidence de l'effet rhizosphère devait amener les auteurs à se servir de techniques qui fussent adaptées au but recherché.

C'est sur des considérations purement quantitatives que furent entrepris les premiers travaux. L'observation microscopique allait permettre d'affirmer qu'il y a une véritable attraction microbienne de la part des racines, ce que d'autres informations vinrent également confirmer.

Puis, l'étude des groupes fonctionnels microbiens, abordée par l'utilisation de milieux électifs ou sélectifs, devait permettre de mettre en évidence leur rôle éventuel dans la rhizosphère et dans le sol.

### A. ETUDE DE LA MICROFLORE BACTERIENNE TOTALE.

Deux sortes de techniques ont été utilisées pour dénombrer les bactéries : la microscopie directe et le milieu collectif.

a) La microscopie directe.

La plupart des auteurs se réfèrent, en y apportant quelques améliorations, à la technique de ROSSI et RICCARDO (1927). Des lames de verre sont pressées contre le sol et la terre adhérente révélée par des colorants d'aniline, puis observée au microscope. Cette méthode, mise à profit par CHOLODNY (1930), DEMETER et MOSSEL (1933), devenait plus convaincante par la prise de clichés photographiques.

HULPOI (1936), ROSSI et coll. (1936) utilisent la technique des "lames enfoncées". Les lames sont enfouies dans le sol où croissent les plantes. Les racines poussent au contact des lames de verre et y laissent une empreinte qui est ensuite colorée. L'influence des racines sur le développement microbien est détectée au microscope.

STARKEY (1938), de la même façon obtient, à l'aide d'une série photographique, une représentation concrète des relations entre racines et microorganismes durant la croissance des plantes. Les lames insérées dans le sol, loin et près des racines sont périodiquement retirées, colorées par le rose Bengale phéniqué, observées au microscope et photographiées. Par cette technique, STILLE (1938), METZ (1955) et ROVIRA (1956) purent étudier la localisation préférentielle des bactéries sur les racines.

LINFORD (1942), effectue des semis dans des boîtes spéciales remplies de sol et percées de "fenêtres" fermées par des lames de verre. Les racines qui se développent contre les fenêtres peuvent être examinées au microscope.

Un dispositif voisin de celui de LINFORD a été décrit par KRASSILNI - KOV (1944), mais les lames portant des empreintes sont recouvertes d'une mince couche d'un milieu gélosé pour permettre la prolifération des bactéries et mycobactéries qui, selon lui, sont difficilement discernables des particules de terre par une coloration directe de l'empreinte des racines.

b) Le milieu collectif.

La méthode des suspensions-dilutions de sol, ensemencées sur des milieux de cultures solides, introduisait la notion d'évaluation avec numération.

C'est avec cette dernière technique que les travaux sont les plus nombreux. Tous les auteurs s'appuient sur le même principe, seule la nature du milieu diffère : ensemencement des plaques de milieu de culture à l'aide de suspensions-dilutions de sol. Après incubation les colonies développées sont dénombrées.

La diversité des formules de ces milieux a malheureusement entraîné des résultats très divergents, parfois contradictoires, sans comparaison possible d'une école à l'autre.

Ces milieux peuvent se diviser en deux groupes. Les milieux organiques très complexes, dits "artificiels" : milieu à la gélatine, proposé par HILTNER (1904), HOFFMAN (1914) ; milieu à la gélose albumine proposé par STARKEY (1929), THOM et HUMFIELD (1932) ; le bouillon de viande gélosé additionné de peptone, et de malt utilisé par MICHOUSTINE (1957). Les milieux dits "naturels", parce qu'ils se rapprochent plus de la composition du sol. Ce sont des milieux à l'extrait de sol seul, ou additionnés de substances plus complexes telle que la peptone (TAYLOR, 1951).

C'est surtout le milieu à l'extrait de sol, introduit par LÖHNIS (1926), qui allait servir à de nombreux auteurs parmi lesquels STARKEY (1939), TIMONIN (1940), WEST et LOCHHEAD (1940), POCHON (1954), ROVIRA (1956), etc. Il est actuellement utilisé par la quasi totalité des chercheurs. Il a l'avantage sur les milieux organiques, de ne pas favoriser toute une flore à croissance rapide qui envahit la gélose, masquant ainsi les germes à développement plus lent. L'addition de peptone et d'extrait de levure par TAYLOR (1951), pour palier à une trop faible teneur en vitamines et facteurs de croissance nécessaire à la prolifération de certains organismes, ne semble pas avoir résisté aux critiques de STEVENSON et ROUATT (1953) et LOCHHEAD et BURTON (1956). Ceux-ci ont montré que le milieu gélose-extrait de sol seul, supportait un plus grand nombre de colonies bactériennes que celui de TAYLOR. D'autre part, ce milieu, par la richesse de sa composition, est très vite envahi préférentiellement par certains germes appartenant à des types zymogènes, rendant difficile l'isolement de toutes les colonies.

## B. ETUDE DES "GROUPES FONCTIONNELS" MICROBIENS.

On entend par "groupes fonctionnels", selon WINOGRADSKY, un ensemble de germes telluriques doués d'une fonction physiologique définie pouvant être mise en évidence. Ainsi, on distinguera pour le cycle de l'Azote : la fixation, l'ammonification, la protéolyse, la nitrification, la dénitrification ; pour le cycle du Carbone : l'amylolyse, la cellulolyse.

Ce sont ces types physiologiques, responsables des différents chaînons, que les milieux visent à mettre en évidence. Leur différenciation se fait par le choix de conditions de culture permettant la prolifération de tel ou tel groupe, la caractérisation finale étant obtenue par l'étude de leur métabolisme biochimique. Ainsi, chaque colonie provenant d'un milieu collectif, peut être testée et classée dans un ou plusieurs de ces groupes. Parmi eux, ceux de la fixation d'azote, de l'ammonification, de la dénitrification et de la cellulolyse ont été les plus étudiés.

Ici encore, les milieux les plus divers sont utilisés, ils sont purement artificiels. Il est difficile, avec de telles méthodes, d'être assuré que des germes ainsi isolés et classés "physiologiquement" soient bien les responsables au sein du sol de la fonction révélée par ces procédés de laboratoire.

Soucieux d'écologie, certains auteurs, WINOGRADSKY (1925), POCHON et TCHAN (1948) ont préconisé l'incorporation d'un substrat défini à la terre. Les germes réagissant au substrat seront préférentiellement stimulés. Les résultats obtenus prêtent encore à discussion : l'accélération du phénomène par des conditions spéciales de température et d'humidité détruit l'équilibre tellurique préexistant et ne permet guère d'apprécier le nombre de microorganismes réellement actifs au sein d'un groupement donné.

D'autres chercheurs utilisent des milieux électifs artificiels et les ensemencent avec un poids connu de terre. Le catabolite formé est dosé chimiquement. KAUFFMANN et BOQUET (1951) apprécient la nitrification en dosant les nitrites et les nitrates formés à partir de sels ammoniacaux, en milieu liquide ensemencé avec un peu de terre. Cette méthode ne peut apporter qu'un renseignement global, chaque souche n'ayant pas toujours la même activité.

La technique de WINOGRADSKY (1925) d'ensemencement de grains de terre, sur plaques de silico-gel imprégnées d'une solution saline et d'un substrat défini, ne peut donner qu'une approximation grossière du nombre de colonies, car pour une relation précise il faudrait supposer que chaque grain réagissant, renferme un seul germe par colonie microbienne. D'autre part, nous ne pouvons en tirer aucun renseignement sur l'activité.

Cependant, après une étude approfondie de la formation du silico-gel (DASTE et HELLER, 1951) qui permit d'en rendre la préparation plus simple et plus rapide, DASTE (1958) obtient une série de résultats (qui seront détaillés plus loin) sur l'évolution des Azotobacter dans certaines rhizosphères et sur l'aspect des phénomènes de cellulolyse et de nitrification.

Ces techniques "écologiques", séduisantes par leur désir de conserver les phénomènes d'antagonisme et de synergisme qui régissent la répartition microbienne du sol, deviennent insuffisantes lorsque l'on désire suivre d'une façon plus précise l'évolution de telle ou telle fonction physiologique, c'est-à-dire, pouvoir juger à la fois du nombre et de l'activité des espèces microbiennes.

A l'exception de l'appréciation de la cellulolyse, pour laquelle la méthode des grains de terre de WINOGRADSKY a été conservée (parce que, dans ce cas, plus sensible), en 1954 J. POCHON mettait au point une méthodologie en "milieux liquides" basée sur les principes écologiques de WINOGRADSKY, alliant à la fois l'aspect quantitatif et qualitatif du phénomène. Elle consiste à ensemencer, à l'aide de suspensions-dilutions de terre, des milieux électifs ou sélectifs liquides répartis dans une série de tubes. Des prélèvements journaliers permettent de suivre le développement microbien, soit par l'observation d'un aspect particulier des cultures, soit à l'aide de tests chimiques par appréciation de la disparition du substrat ou l'apparition d'un catabolite. Dans ce dernier cas, la sensibilité du réactif chimique utilisé pour la lecture, est toujours très supérieur à celle mettant en évidence la culture d'une façon visible, et surtout aux facteurs biologiques déterminant la présence ou l'absence de culture à partir d'un inoculum forcément hétérogène. Les résultats sont exprimés par une courbe de variation du substrat en fonction du temps et des dilutions. La forme de la courbe traduit l'activité du groupement fonctionnel en cause, la dilution limite, le nombre de germes (après application d'une méthode statistique).

Plusieurs critiques peuvent être apportées à cette méthodologie dont la plus grave est celle d'être artificielle par le fait qu'elle utilise des milieux liquides, bien différents du sol, et des substrats qui ne s'y rencontrent pas aux concentrations réalisées dans ces milieux. Nous savons également que le fait de pratiquer des dilutions nécessaires aux ensemencements, produit une ségrégation perturbant les phénomènes de compétition et d'antagonisme si importants dans les interrelations microbiennes telluriques. (Une vérification expérimentale que nous exposerons nous permet de répondre à ces objections). Cependant, elle a l'avantage par sa rapidité et sa simplicité d'exécution, de fournir un "échantillonnage" des diverses fonctions du sol. Les résultats obtenus ainsi, sont sans valeur absolue certes, mais comparables d'une expérience à l'autre, ce qui est essentiel lorsque l'on veut suivre "l'effet rhizosphère" au cours de la croissance de la plante.

Cette discussion montre bien qu'il n'existe encore aucune méthode idéale. En réalité, le genre d'étude entreprise, exige l'association de plusieurs méthodes : d'une part, il faut conserver le caractère écologique qui régit les équilibres microbiens ; d'autre part, il n'est pas possible d'étudier le comportement des germes qui commandent ces équilibres sans les retirer de leur milieu naturel, d'où la nécessité de les placer dans des conditions conventionnelles, mais artificielles, à savoir l'ensemencement de milieux électifs avec des suspensions-dilutions.

## 2. MISE AU POINT ET DESCRIPTION DES TECHNIQUES

Devant l'imperfection des méthodes actuelles, nous avons préféré en raison de ses avantages : rapidité, simplicité d'exécution, reproductibilité, adopter la méthode des milieux liquides de J. POCHON (1954).

### A. PRINCIPE GENERAL DE LA METHODOLOGIE.

a) Le milieu.

Sauf pour la microflore totale, on utilise soit des milieux électifs, soit des milieux sélectifs. A la suite de WINOGRADSKY (1925), nous entendons par milieu électif, un milieu qui par sa composition en éléments nutritifs ne permet la culture que d'un groupe de bactéries accomplissant dans le sol une fonction déterminée.

Un milieu sélectif est celui qui, par sa seule composition, permettrait la croissance de plusieurs groupes bactériens si la présence d'un agent de sélection, par exemple un antiseptique, ne venait inhiber préférentiellement la culture de tous ces types sauf un.

Qu'il s'agisse de milieux électifs ou sélectifs, ils sont tous à base de solution minérale de WINOGRADSKY diluée au 1/20 et, additionnés d'une solution d'oligo-éléments, si l'on utilise l'eau distillée, à raison de 1 ml par litre de milieu.

Solution minérale de WINOGRADSKY.

| | |
|---|---|
| Phosphate bipotassique | 5 g |
| Sulfate de magnésium | 2,5 g |
| Chlorure de sodium | 2,5 g |
| Sulfate ferrique | 0,05 g |
| Sulfate de manganèse | 0,05 g |
| Eau | 1000 ml |

Solution d'oligo-éléments.

| | |
|---|---|
| Molybdate de potassium | 0,05 g |
| Borate de sodium | 0,05 g |
| Perchlorure de fer, sol. à 28 % | 1 goutte |
| Nitrate de cobalt | 0,05 g |
| Sulfate de cadmium | 0,05 g |
| Sulfate de cuivre | 0,05 g |
| Sulfate de zinc | 0,05 g |
| Sulfate de manganèse | 0,05 g |
| Eau distillée | 1000 ml |

L'électivité ou la sélectivité est généralement conférée au milieu par l'adjonction d'un substrat énergétique défini. Le milieu est ensuite réparti en tubes bouchés au coton et stérilisé.

b) Ensemencement et culture.

L'ensemencement se pratique à l'aide de suspensions-dilutions de terre (dont la préparation sera détaillée plus loin). On ensemence 3 ou 5 tubes par dilution que l'on incube à 28°, durant une période variable suivant le groupe fonctionnel envisagé.

c) Lecture et résultats.

Selon le groupe fonctionnel, on effectue, à des temps définis, des prélèvements stériles dans tous les tubes ; on soumet ensuite ces prélèvements à la technique adéquate à la révélation du phénomène à mettre en évidence. On peut ensuite tracer une courbe portant en abscisse les jours et en ordonnée, les indices de dilutions. Pour plus de précision, on calcule pour chaque point la dilution moyenne qui donne 50 % de tubes positifs en utilisant la méthode des taux cumulatifs de REED et MUENCH (1938).

La méthode n'entraîne cependant pas nécessairement le tracé d'une courbe ; pour certains cas, on effectue une seule lecture à une période définie. La lecture des résultats consiste alors, à compter pour chaque dilution, les tubes donnant une culture et à en déduire par le calcul des probabilités le nombre de germes contenus dans la dilution ayant servi à l'ensemencement. La technique de Mac CRADY est couramment utilisée dans ce but : en se basant sur le nombre de tubes positifs trouvés dans trois dilutions successives et significatives, on détermine le "nombre caractéristique" qui, dans les tables statistiques, donne le nombre de germes le plus probable renfermés dans la dilution. On ramène ensuite à 1 gramme de terre. Cette technique de numération, comme toutes celles pratiquées par culture en bactériologie implique le postulat, d'une prolifération possible à partir d'une cellule unique.

## B) PREPARATION DES DILUTIONS-SUSPENSIONS DE SOL.

A partir des échantillons "Rhizosphère" et "Témoin", prélevés dans les conditions précédemment exposées, on réalise une série à exposants décimaux, de suspensions-dilutions de terre de $10^{-1}$ à $10^{-10}$.

5 g de terre de chacun des échantillons sont broyés au mortier dans 45 ml d'eau stérile (eau de lavage des racines pour la rhizosphère, eau de source pour le témoin) déterminant ainsi la dilution $10^{-1}$.

Pour les dilutions suivantes, on dispose d'une série de tubes stériles contenant 27 ml (quantité nécessaire à l'ensemble des ensemencements) d'eau de source également stérile. A l'aide d'une pipette stérilisée, on prélève 3 ml de la première dilution que l'on reporte dans le tube suivant. On effectue plusieurs aspirations et refoulements, après changement de pipette, on passe à la dilution suivante.

C) MILIEUX DE CULTURE, ENSEMENCEMENT ET LECTURE DES RESULTATS.

Ce sont ceux qui servent à mettre en évidence la microflore totale et les groupes fonctionnels suivants :

| | |
|---|---|
| Cycle de l'Azote | : Fixateurs aérobies (Azotobacter) |
| | Fixateurs anaérobies (Clostridium) |
| | Ammonifiants |
| | Protéolytiques |
| | Nitrifiants |
| | Dénitrifiants |
| Cycle du Carbone | : Amylolytiques |
| | Cellulolytiques |

Hormis les milieux d'évaluation de la microflore totale et des ammonifiants, ils sont conformes à ceux mentionnés dans le Manuel technique d'analyses de J. POCHON et Coll. (1954) et POCHON et TARDIEUX (1962).

a) Microflore totale:

La technique de dénombrement préconisée par J. POCHON utilisait un milieu solide (extrait de sol gélosé). Afin de rendre les résultats comparables à ceux obtenus dans le reste de l'analyse, nous avons mis au point une technique de mesure en milieu liquide. Ce dernier a également l'avantage d'être plus sensible.

1 - Mise au point du milieu.

L'extrait de sol est préparé selon la méthode classique (poids égaux de terre et eau du robinet, autoclavage 1 heure à 130° C. Filtration). Il est important d'avoir un milieu parfaitement clair. Pour ce faire, laisser au repos trois jours à 4°C le premier extrait de terre, puis l'autoclaver une seconde fois à 115° pendant 20 minutes. Ajuster à pH 7 s'il y a lieu. Filtrer sur papier. Répartir en tubes de 22 mm de diamètre à raison de 5 ml par tube. Boucher au coton. Stériliser à 110°, 20 minutes.

2 - Ensemencement.

On utilise les dilutions-suspensions de sol à analyser de $10^{-1}$ à $10^{-10}$ à raison de 1 ml par tube et 5 tubes par dilution.

Une seule lecture est pratiquée après 15 jours d'incubation à 28°. Le développement bactérien se traduit par un trouble du milieu.

b) Groupes fonctionnels.

1 - Fixation de l'azote.

On utilise des milieux électifs, ne contenant pas d'azote combiné, seuls les fixateurs peuvent s'y développer.

- Fixation aérobie (Azotobacter).

Milieu : c'est celui de TCHAN (1952), modifié par AUGIER (1956).

| | |
|---|---|
| Solution minérale de WINOGRADSKY | 50 ml |
| Mannitol | 10 g |
| Extrait de sol | 10 ml |
| $CO_3$ Ca | 1 g |
| Solution d'oligo-éléments | 1 ml |
| Eau distillée Q. S. P. | 1000 ml |

Boucher au coton ; stériliser à l'autoclave 20 minutes à 110° C.

Ensemencement : on utilise les dilutions-suspensions de terre de $10^{-1}$ à $10^{-6}$, à raison de 1 ml par tube et 5 tubes par dilution. Après incubation de 15 jours à 28°, la lecture se fait par appréciation d'un voile ou d'un anneau visqueux parfois brunâtre.

- Fixation anaérobie (Clostridium).

Milieu (AUGIER 1956) :

| | |
|---|---|
| Solution minérale de WINOGRADSKY | 50 ml |
| Phosphate monopotassique | 0,75 g |
| Soude N/10 | 33 ml |
| Glucose | 10 g |
| Extrait de sol | 10 ml |
| Solution d'oligo-éléments | 1 ml |
| Eau distillée Q. S. P. | 1000 ml |

Répartir en tubes de 17 mm de diamètre, à raison de 10 ml par tube pour avoir un rapport surface/volume faible. Mettre dans chacun d'eux une petite cloche à gaz de Durham. Boucher au coton, stériliser 20 minutes à 110°C.

Ensemencement : On utilise les suspensions-dilutions de terre de $10^{-1}$ à $10^{-8}$, à raison de 1 ml par tube et 5 tubes par dilution. Après incubation de 15 jours à 28°, la formation de gaz $CO_2$ et $H_2$ dans les cloches, indiquent la présence de Clostridium.

2 - Ammonification.

Le milieu électif mis au point par de BARJAC et POCHON (1956), pour caractériser l'ammonification, est basé sur la disparition de la fonction phénol du noyau tyrosine et non sur l'utilisation de la fonction aminée (des expériences ont montré, de fait, que l'utilisation de la fonction aminée était parallèle à la disparition de la fonction phénolique).

La tyrosine a de plus, l'inconvénient d'être un acide aminé peu soluble, fragile aux températures de stérilisation.

Pour ces raisons, nous avons substitué à la tyrosine, l'asparagine qui a l'avantage d'être assez soluble et stérilisable à l'autoclave.

Nous avons également choisi un test de caractérisation mettant directement en évidence la libération d'ammoniac à partir de la fonction aminée de l'amide.

Milieu :

| | |
|---|---|
| Solution minérale de WINOGRADSKY | 50 ml |
| Asparagine | 0,2 g |
| Solution oligo-éléments | 1 ml |
| Eau distillée Q. S. P. | 1000 ml |

Pour faciliter la dissolution de l'asparagine, broyer au préalable les cristaux à sec dans un mortier. Répartir la solution en tubes de 22 mm de diamètre, à raison de 10 ml par tube. Boucher au coton, stériliser 20 minutes à 112°C.

Ensemencement : on utilise les dilutions-suspensions de terre de $10^{-1}$ à $10^{-10}$, à raison de 1 ml par tube et 3 tubes par dilution. Incubation à 28°.

Les lectures sont pratiquées sur des prélèvements stériles effectués dans chaque tube le 1er, 2e, 3e, 4e, 5e, 7e, 9e, 11e et 15e jour.

La formation de $NH_3$ est mise en évidence avec 1 goutte du réactif de Nessler dans chaque prélèvement. Une teinte jaune traduit une faible quantité de $NH_3$, un précipité jaune orange une forte quantité.

Une objection peut être faite : l'asparagine est une amide. Des essais avec l'acide aspartique ont abouti à des courbes d'activité un peu plus lentes, mais le nombre de germes, traduit par la dilution limite, est resté le même.

3 - Protéolyse.

L'électivité est conférée au milieu par addition de gélatine comme seule source de carbone et d'azote.

Milieu : (LAJUDIE et CHALVIGNAC, 1956).

| | |
|---|---|
| Solution minérale de WINOGRADSKY | 50 ml |
| Gélatine | 30 g |
| Solution d'oligo-éléments | 1 ml |
| Eau distillée Q. S. P. | 1000 ml |

Chauffer doucement pour fondre la gélatine. Ajuster si besoin à pH 7,2, répartir en tubes de Kahn à raison de 20 ml par tube. Stériliser 20 minutes à 110°C.

Ensemencement : Utiliser les dilutions-suspensions de terre de $10^{-1}$ à $10^{-8}$ à raison de 1 ml par tube et 3 tubes par dilution. Incubation à 28°. Lecture après 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9 11, 13 jours par appréciation de la liquéfaction de la gélatine après un séjour de tous les tubes au réfrigérateur à + 2°, pendant 1 heure et demie.

4 - Nitrification.

On utilise deux milieux électifs où l'azote est fourni sous forme de sulfate d'ammonium pour la recherche des germes nitreux, sous forme de nitrite de sodium pour la recherche de germes nitriques.

- Germes nitreux (COPPIER et de BARJAC, 1952) :

Milieu :

| | |
|---|---|
| Solution minérale de WINOGRADSKY | 50 ml |
| Sulfate d'ammonium | 0,5 g |
| Carbonate de calcium | 1 g |
| Eau distillée Q. S. P. | 1000 ml |

- Germes nitriques (COPPIER et de BARJAC, 1952) :

Milieu :

| | |
|---|---|
| Solution minérale de WINOGRADSKY | 50 ml |
| Nitrite de sodium | 1 g |
| Carbonate de calcium | 1 g |
| Eau distillée Q. S. P. | 1000 ml |

Afin de favoriser l'aérobiose du milieu indispensable aux nitrificateurs, nous avons augmenté le rapport surface/volume en remplaçant les tubes à hémolyse préconisés par les auteurs, par des tubes de 17 mm de diamètre, à raison de 5 ml par tube. Stériliser à 110°C, 20 minutes.

Ensemencement : Pour les deux milieux, utiliser les suspensions de terre de $10^{-1}$ à $10^{-6}$, à raison de 1 ml par tube et 3 tubes par dilution. Lectures après 20 jours d'incubation à 28°C. La présence des germes nitreux est recherchée par la formation de nitrites (à partir du $SO_4(NH_4)^2$), révélée par le réactif à la diphénylamine sulfurique. La présence de germes nitriques se traduit par la formation de nitrates (à partir du $NO_2Na$), révélée par la diphénylamine sulfurique après élimination, par l'urée en milieu sulfurique, des nitrites restants du milieu.

5 - Dénitrification.

Milieu (de BARJAC, 1952) :

| | |
|---|---|
| Solution minérale de WINOGRADSKY | 50 ml |
| Nitrate de potassium | 2 g |
| Glucose | 10 g |
| Carbonate de calcium | 5 g |
| Solution d'Oligo-éléments | 1 ml |
| Eau distillée Q. S. P. | 1000 ml |

Répartir en tubes de 17 mm de diamètre, à raison de 10 ml. Stériliser à l'autoclave 20 minutes, à 110°C.

Ensemencement : Utiliser les suspensions-dilutions de terre de $10^{-1}$ à $10^{-8}$, à raison de 1 ml et 3 tubes par dilution. Incubation à 28°.

Lectures après 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 et 13 jours par prélèvements stériles.

Dans chaque prélèvement, on recherche l'apparition des nitrites par le réactif de Greiss et la disparition des nitrates avec le réactif à la diphénylamine, après élimination des nitrites par l'urée.

6 - Amylolyse.

On utilise un milieu électif renfermant de l'amidon comme unique source de carbone.

Milieu (de BARJAC et CHALVIGNAC, 1954) :

| | |
|---|---|
| Solution minérale de WINOGRADSKY | 50 ml |
| Extrait de Sol | 10 ml |
| Amidon de riz | 1,5 g |
| Nitrate d'ammonium | 1 g |
| Solution d'oligo-éléments | 1 ml |
| Eau distillée Q. S. P. | 1000 ml |

Répartir en tubes de 22 mm de diamètre, à raison de 10 ml par tube. Stériliser à l'autoclave 20 minutes, à 110°C.

Ensemencement : Utiliser les suspensions-dilutions de terre de $10^{-1}$ à $10^{-8}$, à raison de 1 ml par tube et 3 tubes par dilution. Incubation à 28°C.

Lectures après 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13 jours sur des prélèvements stériles dans chaque tube.

On recherche l'hydrolyse de l'amidon par le réactif iodo-ioduré.

7 - Cellulolyse.

On utilise la technique des grains de terre de WINOGRADSKY (1929).

Milieu : préparation du Silico-gel.

Préparer les deux solutions suivantes :

- Silicate de soude : Partir du silicate de soude en solution concentré dit "technique" du commerce. Amener avec de l'eau à densité 1,06 (13° B).
- Acide chlorhydrique : Partir de l'acide chlorhydrique pur du commerce, puis amener avec de l'eau à densité 1,10 (6,8° B).

Mélanger à parties égales les deux solutions. Immédiatement avec une éprouvette, verser 30 ml du mélange par boîte de Pétri (10 cm de dia-

mètre). Laisser reposer jusqu'au lendemain.

Laver à l'eau courante le gel formé, pour éliminer l'excès d'acide et de chlorure de sodium pendant 48 heures.

Les boîtes égouttées et fermées avec leur couvercle peuvent être conservées au réfrigérateur un mois.

Imprégner chaque plaque avec 2 ml de la solution saline de Winogradsky additionnée de 1 % de nitrate d'ammonium. Stériliser en exposant ces plaques aux rayons U. V. pendant 20 minutes. La cellulose est introduite sous forme d'une feuille de papier-filtre Durieux stérilisée au préalable et déposée à la surface du silico-gel.

Ensemencement : On utilise 3 boîtes par prélèvement et l'on dispose sur chacune 25 grains de terre. Les lectures se font après 15 jours d'incubation par comptage de grains de terre positifs. La culture se traduit par une coloration rose ou jaune le plus souvent ou, une tache d'aspect visqueux entourant le grain de terre.

## D) VALIDITE DE LA METHODE.

Nous avons tenté de répondre d'une façon indirecte aux critiques déjà signalées, en cherchant à savoir si la répartition quantitative des germes des divers groupes fonctionnels révélés par les milieux électifs liquides, pouvaient être retrouvée par l'étude de ces mêmes activités physiologiques à partir des colonies microbiennes obtenues sur plaque de gélose-extrait de sol ensemencée avec une suspension-dilution de la terre à analyser.

Le mélange gélose-extrait de sol, milieu collectif, permet la culture de tous les types microbiens quelle que soit leur physiologie nutritionnelle, tout en respectant leur répartition proportionnelle (pour une dilution donnée). Si donc nos méthodes d'estimation sont valables, on doit retrouver avec les deux variantes de techniques, un équilibre tellurique analogue.

1) Répartition des groupes fonctionnels sur boîte de gélose extrait de sol.

Technique :

Un milieu à l'extrait de sol gélosé est ensemencé avec 1/10 de ml d'une suspension-dilution de terre, dilution choisie de telle façon que l'on puisse prélever facilement toutes les colonies (soit une trentaine par boîte). Après huit jours d'incubation à 28°, chaque colonie prélevée stérilement est portée dans un tube de milieu à l'extrait de sol, mis à l'étude à 28°, pendant 24 ou 48 heures, selon la vitesse de croissance du germe. Toutes les cultures obtenues (96), après contrôle de pureté, sont testées sur tous les milieux électifs décrits par J. POCHON (1956), vis-à-vis des fonctions suivantes : ammonification, dénitrification, protéolyse et amylolyse. Les lectures sont pratiquées après 10 jours d'incubation à 28°.

Résultats :

On effectue un comptage des souches proliférant sur les milieux utilisés ; une répartition proportionnelle peut ainsi être établie. Par ordre décroissant, nous trouvons :

| | |
|---|---|
| Milieu collectif à l'extrait de sol | 100 % |
| Milieu électif (protéolytiques) | 83 % |
| Milieu électif (dénitrifiants) | 35 % |
| Milieu électif (ammonifiants) | 34 % |
| Milieu électif (amylolytiques) | 25 % |

Toutes les souches obtenues sur extrait de sol sont actives sur un ou plusieurs milieux électifs et peuvent donc être classées dans un ou plusieurs groupes fonctionnels.

Nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus par les techniques d'analyses courantes, c'est-à-dire ensemencement direct dans des milieux électifs avec des dilutions-suspensions de terre (microflore totale dans son équilibre naturel). Les dilutions limites d'activité sont :

| | |
|---|---|
| Microflore totale | $3 \times 10^7$ |
| Protéolytiques | $1,7 \times 10^7$ |
| Dénitrifiants | $2,5 \times 10^6$ |
| Ammonifiants | $1,4 \times 10^6$ |
| Amylolytiques | $9,5 \times 10^5$ |

Il n'est évidemment pas possible, de comparer ces résultats exprimés en valeur absolue avec ceux cités plus haut qui traduisent un pourcentage de colonies microbiennes, mais on peut voir que ces deux groupes de résultats montrent une identité, dans l'ordre du classement des différents groupes fonctionnels, que l'on utilise la méthode d'appréciation sur milieu électif, ou la méthode indirecte après isolement de colonies sur milieu collectif. Ainsi se trouve explicitée la validité de nos méthodes de mesures quantitatives et qualitatives.

2) Plurivalence des microorganismes telluriques.

L'examen du premier groupe de résultats montre en outre, que de nombreuses souches sont certainement inventoriées plusieurs fois dans diverses fonctions puisqu'elles se cultivent sur plusieurs milieux électifs (le total des pourcentages partiels dépassant largement 100 %). Nous avons profité de cette observation pour préciser, dans cette série d'expériences, l'importance quantitative de ce phénomène qui peut avoir un grand intérêt dans la biologie du sol, à savoir : les microorganismes telluriques possèdent-ils bien un équipement enzymatique capable de leur permettre de remplir plusieurs fonctions, retenues comme caractéristiques en microbiologie du sol, c'est-à-dire, peuvent-ils être classés à la fois dans plusieurs groupements fonctionnels ?

Méthode :

Chacun des milieux électifs cités précédemment est gélosé à 15 p. 1000. On pratique l'ensemencement à l'aide des suspensions-dilutions de terre déjà utilisées. On incube 5 jours à 28° et on prélève sur chaque milieu une cinquantaine de colonies.

Par définition, les germes obtenus métabolisent électivement la substance introduite dans le milieu. Nous éliminons toute une flore secondaire survenant plus tardivement, utilisant les produits de dégradation des premiers, en ayant soin de prélever les colonies d'apparition précoce.

Chaque souche est ensuite testée par notre méthode sur son propre milieu électif et sur les autres milieux.

Résultats :

Ammonifiants : colonies prélevées à partir d'un milieu gélosé pour ammonifiants, puis testées sur :

| | |
|---|---|
| Milieu électif pour ammonifiants | 100 % de cultures positives |
| Milieu collectif | 100 % de cultures positives |
| Milieu électif pour dénitrifiants | 80 % de cultures positives |
| Milieu électif pour protéolytiques | 80 % de cultures positives |
| Milieu électif pour amylolytiques | 10 % de cultures positives |

Dénitrifiants : colonies isolées à partir d'un milieu gélosé pour dénitrifiants, puis testées sur :

| | |
|---|---|
| Milieu électif pour dénitrifiants | 100 % de cultures positives |
| Milieu collectif | 100 % de cultures positives |
| Milieu électif pour protéolytiques | 64 % de cultures positives |
| Milieu électif pour ammonifiants | 25 % de cultures positives |
| Milieu électif pour amylolytiques | 0 % de cultures positives |

Protéolytiques : la culture se traduisant par une liquéfaction de la gélatine, l'isolement des colonies n'a pas été possible.

Amylolytiques : colonies isolées à partir d'un milieu gélosé pour amylolytiques, puis testées sur :

| | |
|---|---|
| Milieu électif pour amylolytiques | 100 % de cultures positives |
| Milieu collectif | 100 % de cultures positives |
| Milieu électif pour protéolytiques | 100 % de cultures positives |
| Milieu électif pour dénitrifiants | 60 % de cultures positives |
| Milieu électif pour ammonifiants | 10 % de cultures positives |

De ces différents tableaux, il ressort :

1. Quel que soit le groupe fonctionnel auquel il appartient, tout germe possède dans son équipement enzymatique, un certain lot d'enzymes permettant sa croissance en extrait de sol et son classement dans plusieurs

groupes fonctionnels. Son activité est donc plurivalente.

2. Le type du milieu d'isolement n'influence pas l'ordre de répartition quantitative des groupes entre eux mais, à l'exception du groupe sélectionné, amène des variations dans le nombre des organismes à l'intérieur de ces groupements. Exemple : le pourcentage des souches ammonifiantes est de 35 si celles-ci proviennent d'un isolement sur milieu solide à l'extrait de sol. A partir d'un milieu solide pour dénitrifiants, il n'est que de 25 et, d'un milieu pour amylolytiques, de 10.

Une attention particulière a été portée sur la relation entre la flore dénitrifiante et la flore amylolytique. Le pourcentage des germes isolés sur le milieu nitrate-glucose (dénitrification) et, capables d'hydrolyser totalement l'amidon est nul. Par contre, celui des germes isolés sur amidon, et doués d'un pouvoir réducteur de nitrates, est de 60 %. Nous avons tenté d'expliquer ce phénomène par le fait que, la majorité des germes réducteurs de nitrates ont un équipement enzymatique qui ne leur permet d'utiliser que les sucres simples (glucose dans ce cas) quant à leur métabolisme carboné, alors que ceux isolés d'un milieu à l'amidon sont évidemment, de plus, capables d'utiliser le glucose. Ceci confirme l'hypothèse déjà émise au cours d'un article antérieur (1953) : l'amylolyse se fait en deux temps, hydrolyse enzymatique avec formation de dextrine, maltose, glucose et fermentation ultérieure de ces glucides par d'autres espèces bactériennes.

Cette série d'expériences a, en fait, un peu débordé le but que nous nous étions fixé, à savoir : dans quelle mesure la méthode des suspensions-dilutions ensemencées dans des milieux liquides électifs reproduit-elle une image fidèle de l'activité bactérienne au sein du sol ?

Les résultats obtenus permettent de conclure : quelle que soit la technique utilisée, la répartition quantitative des germes dans les différents groupes fonctionnels s'établit dans le même ordre : Microflore totale, protéolytiques, dénitrifiants, ammonifiants, amylolytiques, démontrant ainsi la validité de la méthode.

Chapitre III

# ETUDE DE "L'EFFET RHIZOSPHERE" SUR LA MICROFLORE TOTALE ET LES DIFFERENTS GROUPES FONCTIONNELS BACTERIENS

## 1. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Malgré la diversité des méthodes utilisées pour l'étude du phénomène, les auteurs s'accordent pour trouver que "l'effet rhizosphère" se traduit principalement par une stimulation des microorganismes, de certaines espèces en particulier, et par des modifications dans la répartition quantitative des groupes fonctionnels, c'est-à-dire des groupes bactériens responsables chacun pour leur part de l'activité d'un chaînon des grands cycles biologiques telluriques.

Nous ne retiendrons de cette revue historique que les principaux travaux dégagés d'un immense ensemble dont les résultats ne font que confirmer ceux des chefs de file des principales écoles.

Précisons que le peu de recherches effectuées sur le Lin nous oblige, pour exposer l'état actuel de la question, à nous servir de résultats obtenus avec d'autres espèces végétales.

### A) STIMULATION DES MICROORGANISMES.

Les informations dérivent soit d'observations microscopiques directes, soit de dénombrements par la méthode des plaques.

Par la technique de lames enfouies, CHOLODNY (1930), STILLE (1938), TIMONIN (1940) observent une abondance particulière de bactéries au niveau du chevelu radicellaire. Dans certains cas, STARKEY (1938), METZ (1955) notent un véritable manteau cellulaire qui entoure les racines. D'intéressantes observations furent également mentionnées par ROVIRA (1956), à propos de la localisation des bactéries sur les racines de jeunes plantules d'avoine : le chevelu est entouré d'une grande quantité de microorganismes alors que l'extrémité reste libre de bactéries.

Utilisant des méthodes de coloration directe des racines et ses chambres spéciales d'observations, LINFORD (1942) montre que les bactéries se développent préférentiellement sur les très jeunes radicelles. ROVIRA (1956), par d'autres procédés de coloration, arrive aux mêmes conclusions.

D'une manière plus évidente, la stimulation fut dénoncée par comptage des colonies sur plaques de gélose-extrait de sol ou autres milieux solides (milieu à l'albumine d'oeuf, milieu à la gélatine, milieu de Waksman à l'albuminate de sodium, milieu de Czapeck à la peptone glucosée) ensemencés par des dilutions de terre.

Suivant les auteurs et les milieux utilisés, il y a de grandes variantes pour une même espèce végétale ; c'est ainsi que, pour le Blé, le coefficient R/S a été trouvé de :

7,7 (TIMONIN, 1940), 6,7 (WALLACE et LOCHHEAD, 1949), 27,7 (RIVIERE, 1959).

Cependant, à l'intérieur d'une même école, utilisant une même méthodologie, on peut admettre des valeurs significatives du coefficient R/S pour caractériser les "effets rhizosphère". THOM et HUMFIELD (1932) trouvent 27 fois plus de bactéries que dans le sol banal, KRASSILNIKOV (1936) 25 à 1000 fois plus, CLARK (1939) 2 à 24 fois, TIMONIN (1940) 7 à 71 fois plus, LOCHHEAD (1940) 2 à 45 fois, ZUKOVKAYA (1941), 100 fois, STARKEY (1955) 40 à 130 fois, BALICKA (1958) 10 à 12 fois, RIVIERE (1959) 2 à 27 fois. Nous trouvons donc des "effets rhizosphère" allant de 2 à 1000. Cet énorme éventail est fonction non seulement des techniques et milieux utilisés par les divers auteurs, mais aussi de facteurs qui ont pu être précisés.

Trois facteurs paraissent en effet jouer un rôle prépondérant dans la stimulation des microorganismes : l'espèce végétale, le stade de développement de la plante, la nature du sol (bien que ce dernier point, nous le verrons plus loin, comporte encore des contradictions).

a) L'espèce végétale.

S'il y a divergence d'opinion concernant une même famille végétale, l'ensemble des résultats, presque sans exception, montre que les Légumineuses hébergent un plus grand nombre de microorganismes que les Céréales. Dès 1895, CARON dénombre 4 fois plus de bactéries sous le Trèfle que sous la Betterave à sucre ; STARKEY (1939) attribue une moyenne de 50 fois plus de bactéries sur les racines de Légumineuses et de 12 fois plus seulement sur les racines de Céréales dans un même sol par rapport au sol témoin. ADATI (1939) note un "effet rhizosphère" de 7 pour le Blé et 200 pour le Pois.

TIMONIN (1940) obtient les R/S suivants :

| | |
|---|---|
| Luzerne | 71 |
| Pois | 37,8 |
| Blé | 19,1 |
| Avoine | 12,8 |

GREAVES (1914) trouve plus d'organismes sous le Blé que sous la Luzerne, mais en 1928 CREUZBERG publie des résultats contraires : TIMONIN (1940) note des R/S différents pour le Blé et l'Avoine ;

WALLACE et LOCHHEAD (1949) concluent à un effet rhizosphère différent pour le Blé, l'Avoine, le Trèfle, la Fléole, la Luzerne et le Lin. STRZELCZYK (1961), étudiant l'effet rhizosphère du Radis, de l'Oignon et du Blé, trouve que le Radis et l'Oignon hébergent un plus grand nombre de bactéries que le Blé.

Les travaux de KRASSILNIKOV (1936) n'ont cependant pas toujours fourni des résultats en faveur d'une "spécificité rhizosphérique" apportée par la plante.

Dans certains cas, KRASSILNIKOV et ses coll. (1936) observent des augmentations massives de microorganismes dans la rhizosphère du Blé, du Maïs, du Tournesol et du Soja, la plus importante étant dans celle du Soja, la plus petite dans celle du Blé. Dans un autre cas, il note : "les différences dans la composition quantitative de la rhizosphère de plantes variées sont faibles et on ne peut pas détecter régulièrement des différences significatives. Ainsi, dans un même secteur de champ, sous des conditions agronomiques et climatiques identiques, le nombre total des bactéries de la rhizosphère du Blé, de l'Avoine et du Seigle sont approximativement les mêmes".

KING et WALLACE (1956) arrivent aux mêmes conclusions.

Des variétés d'une même espèce peuvent donner lieu à des "effets rhisozphère différents". Les rhizosphères des variétés de Lin sensibles à la flétrissure et les variétés de Tabac sensibles au noircissement des racines hébergent plus de bactéries que les variétés résistantes (THOM et HUNFIELD, 1932 ; TIMONIN, 1940 ; LOCHHEAD, TIMONIN et WEST, 1940). Les mêmes résultats sont obtenus avec la pourriture de la Banane par HARPER (1950) ; RIVIERE (1959) mentionne également des différences avec des variétés de Blé plus ou moins aptes au tallage. Le coefficient R/S augmente avec la quantité de talles.

b) Le stade de croissance.

Dans toutes les études, il apparaît que le stade de croissance influence la population microbienne des racines. STARKEY (1929) note un petit nombre de bactéries aux premiers stades, puis une augmentation lorsque les plantes atteignent une taille importante et une diminution après la fructification. GRAF (1930), KRASSILNIKOV (1934), KRASSILNIKOV et coll. (1936), TIMONIN (1940), KATZNELSON, LOCHHEAD et TIMONIN (1948), indiquent que le maximum se situe vers la floraison ou quelque temps avant. Il se trouve pour le Blé, à l'épiaison selon PANTOS (1956), au tallage selon RIVIERE (1959).

Cependant, si l'on examine les résultats de WALLACE et LOCHHEAD (1949), on s'aperçoit que le R/S maximum n'est pas toujours situé vers la floraison mais, pour certaines plantes, à la germination.

| | Germination | Floraison |
|---|---|---|
| Blé | 4,08 | 6,7 |
| Avoine | 8,3 | 5 |
| Trèfle | 25 | 15 |
| Fléole | 6 | 3,2 |
| Luzerne | 6,1 | 15 |
| Lin | 5,3 | 11 |

Le stade de la germination a été particulièrement étudié par TIMONIN (1940), ROVIRA (1956), ROUATT (1959) : trois jours après la germination, le coefficient R/S du Blé atteint déjà 2,3 et passe à 5 dès le 10e jour (ROUATT, 1959). Les coefficients publiés par TIMONIN (1940) sont encore plus élevés : 12,9 à 16,1 également pour le Blé.

c) La nature du Sol.

Les travaux sont assez contradictoires. Il y a lieu de distinguer les travaux portant sur des types de sols pédologiquement définis et ceux ayant trait aux sols qui ont vu leur composition modifiée par l'apport de substances organiques ou minérales métabolisables (engrais).

1°) Influence des types de Sol.

Il y a peu de travaux. THOM et HUMFIELD (1932) notent des variations importantes quant à la quantité de bactéries de la rhizosphère lorsqu'ils sèment du Blé dans des sols dont le pH varie de 4,5 à 8,1. C'est au voisinage de la neutralité que celles-ci sont les plus nombreuses.

ADATI (1939), CLARK (1940), STRZELCZYK (1961) notent que les R/S décroissent avec la richesse en humus ; plus un sol est humifié, plus le R/S est bas. Ainsi, STRZELCZYK (1961), utilisant un sol argilo-sableux à pH 7, contenant 5 % de matière organique et un sol sableux à pH 5 (neutralisé par du $CO_3Ca$), contenant 1,2 % de matière organique, publie les résultats suivants :

| | | Sol argilo-sableux R/S | Sol sableux R/S |
|---|---|---|---|
| Radis | 21 jours | 17 | 21,4 |
| | 70 jours | 37 | 43,2 |
| | 100 jours | 15,2 | 31,9 |
| Oignon | 21 jours | 3,7 | 5,8 |
| | 70 jours | 29,4 | 47,3 |
| | 100 jours | 62,5 | 83,5 |
| Blé | 21 jours | 28,2 | 13,5 |
| | 70 jours | 12,5 | 16,9 |

D'une façon indirecte, ces résultats rejoignent ceux de POCHON (1956) et NILSSON (1957) : les rapports R/S sont d'autant moins élevés que le sol est plus riche en microorganismes, la richesse microbienne étant liée à la teneur en matière organique.

Par contre, PANTOS (1956) ne trouve pas de différence sur des cultures de Blé provenant de podzol ou de tchernozen. Ceci l'amène à conclure que c'est d'abord la plante avec ses réactions qui joue le rôle décisif dans l'établissement de la rhizosphère et non le sol.

2°) Influence des traitements de Sol.

TAYLOR et LOCHHEAD (1938), étudiant l'effet rhizosphère proche de la racine dans un sol traité depuis plusieurs années par du fumier de ferme et un autre par des engrais minéraux, concluent qu'il n'y a aucune altération des groupes bactériens. Sur des échantillons de sols fumés ou stérilisés, mis en pots et ensemencés avec du Blé, CLARK (1939) trouve que les traitements n'influencent pas la microflore de la rhizosphère. TIMONIN (1939) arrive aux conclusions de TAYLOR et LOCHHEAD avec l'Avoine et le Trèfle cultivés dans des champs fumés. KATZNELSON et RICHARDSON (1943) montrent que les fumiers organiques ne modifient pas beaucoup l'effet rhizosphère. Cependant, un intéressant travail de KATZNELSON (1946) suggère que le traitement du sol peut exercer son effet indirectement, en influençant la croissance du végétal : dans un sol fumé, le nombre des bactéries est maximum à la période de pleine activité de la Betterave qui se développe vigoureusement tandis que, dans un sol non fertilisé, les plantes poussant plus lentement, le maximum de "l'effet rhizosphère" se déplace vers la maturité.

Il faut signaler les travaux de FEDOROV et NEPOMILOVEV (1954), puis ceux de POCHON (1956), au sujet du retentissement de l'apport d'engrais organiques et minéraux sur la stimulation des bactéries de la rhizosphère. MACURA (1958) publie également que la fertilisation minérale influence particulièrement la microflore des racines.

## B) REPARTITION DES GROUPES FONCTIONNELS.

En 1935, THOM notait que les microorganismes associés aux racines appartiennent à des espèces décomposant la matière organique fraîche du sol et non à celles dégradant les substances humiques. Cette flore des racines serait constituée d'organismes à croissance rapide, ayant un pouvoir saccharolytique et protéolytique accusé.

Un grand nombre de tests portant sur les diverses activités physiologiques des microorganismes devaient par la suite confirmer cette hypothèse et amener KATZNELSON et ROUATT (1957, à conclure : "Dans la rhizosphère, il se produirait une sorte de sélection des bactéries du sol, les plus actives physiologiquement et à taux de croissance élevé".

L'action sélective des racines d'une grande variété de plantes était observée par KRASSILNIKOV, KRISS et LITVINOV (1936). Ces auteurs

détectaient une prédominance de microorganismes décomposant la cellulose et de bâtonnets ammonifiants.

LOCHHEAD (1940) indique un pourcentage plus élevé de formes liquéfiant la gélatine et fermentant le saccharose dans la rhizosphère du Trèfle, de l'Avoine, du Tabac, du Lin et du Blé.

BEREZOVA (1946) note une augmentation de bactéries dénitrifiantes.

KATZNELSON (1946), KATZNELSON, ROUATT et PAYNE (1956), sur le Blé et la Betterave, indiquent une stimulation des cellulolytiques, des bactéries ammonifiantes et dénitrifiantes alors que les fixateurs d'azote (Azotobacter) ne sont pas affectés.

DASTE (1958) étudie d'une façon plus approfondie l'évolution des Azotobacter dans la rhizosphère de l'Ephédra, du Pin Maritime et du Blé et montre que les effets d'inhibition ou de stimulation relevés, peuvent être occasionnés par des facteurs variés. Ainsi, il met en cause une substance toxique voisine de l'éphédrine dans les racines de l'Ephédra, alors que chez le Pin Maritime, le pH acide du sol ambiant serait à l'origine du phénomène d'inhibition. Chez le Blé, une phase stimulante suivie d'une action inhibitrice, pourrait être provoquée par l'accumulation d'un facteur devenant toxique aux fortes concentrations, action analogue aux substances de type auxinique. Enfin, l'existence d'associations bactériennes favorisées au contact de certaines racines auraient aussi une part importante dans la stimulation de certains groupes fonctionnels. Dans la rhizosphère du Pin, cet auteur décèle une association étroite entre une espèce de Flavobacterium (F. resinovorum) à caractères très particuliers, et un Azotobacter. Dans la rhizosphère de l'Ephédra, c'est une association cellulolytique fréquente entre un Vibrio et un Champignon non identifiés.

KATZNELSON et ROUATT (1957), utilisant les tests suivants : réduction du bleu de méthylène, fermentation du glucose, pouvoir ammonifiant et dénitrifiant, trouvent une proportion plus élevée de bactéries capables de réduire le bleu de méthylène, de faire fermenter le glucose et de produire de l'ammoniac à partir de peptone.

KING et WALLACE (1956), pour l'Orge et le Blé, révèlent une augmentation significative des bactéries réduisant les nitrates et une diminution des organismes hydrolysant l'amidon, liquéfiant la gélatine. Dans la rhizosphère de l'Avoine, ZAGALLO et KATZNELSON (1957), avec des tests différents : oxydation du glucose, de l'alanine, de l'acétate et de succinate confirment ces résultats. MACURA (1957) note une grande abondance de germes réduisant les nitrates, liquéfiant la gélatine et fermentant le saccharose dans la rhizosphère de la Betterave sucrière. RAMBELLI (1959), dans une étude de sol planté en Eucalyptus, note un accroissement de la flore ammonifiante et dénitrifiante, la nitrification et la fixation d'azote semblent négligeables, la cellulolyse est décroissante ; RIVIERE (1959), sur le Blé, obtient un effet stimulant de tous les groupes fonctionnels, à l'exception des cellulolytiques, avec leur maximum à la période du tallage. IVARSON et KATZNELSON (1960) enregistrent sur le bouleau une stimulation des ammonifiants et réducteurs du bleu de méthylène. STRZELCZYK (1961) montre que le nombre de microorganismes réduisant le bleu de

méthylène, produisant des gaz à partir du glucose, ammonifiants, dénitrifiants et cellulolytiques sont préférentiellement stimulés, cet effet préférentiel dépendant de l'espèce, de l'âge de la plante et du type de sol en ce qui concerne les cellulolytiques.

Malheureusement, tous ces auteurs ont travaillé avec des techniques différentes, nullement comparables entre elles et le plus souvent non quantitatives. Cependant, les résultats peuvent se schématiser ainsi :

Fixation de l'azote atmosphérique : Suivant les travaux, il y a stimulation, inhibition, ou pas de modification des Azotobacter dans la rhizosphère.

Ammonification : Stimulation très nette.

Nitrification : Les résultats sont variables, mais on peut admettre qu'il n'y a pas de stimulation.

Dénitrification : Stimulation.

Cellulolyse : Stimulation au stade de la maturité.

## 2. ETUDE EXPERIMENTALE DE LA RHIZOSPHERE DU LIN

Des échantillons de sol, prélevés à quatre stades de croissance : germination, un mois après la germination, floraison et fructification, ont été suivis dans leurs évolutions chimique et microbiologique.

L'évolution chimique des prélèvements a été suivie par :

La mesure du pH.
Le dosage de l'Azote total (méthode de KJELDAHL).
Le dosage du Carbone (méthode de ANNE modifiée par DUCHAUFOUR, 1945).

L'étude microbiologique des échantillons a porté sur la microflore totale et les groupes fonctionnels déjà cités.

Selon l'idée émise par KATZNELSON (1946), les résultats sont exprimés par le rapport $\frac{\text{rhizosphère}}{\text{sol}}$ (R/S), représentant le nombre d'organismes de la rhizosphère, divisé par le nombre d'organismes du sol prélevé à distance des racines (pour un même poids de prélèvement).

### A) ANALYSE CHIMIQUE DES ECHANTILLONS DE SOLS.

Pour une meilleure compréhension de nos études bactériologiques, nous donnons une analyse chimique aux différents stades de croissance de la plante, des deux variétés de sol utilisées.

Culture en pot.

Il s'agit d'une terre de jardin de couleur gris-brun.

Tableau I

EVOLUTION CHIMIQUE DES ECHANTILLONS DE SOL
AU COURS DE LA CROISSANCE DU LIN
(culture en pot)

| | Témoin sans plante | Germination | Après germination | Floraison | Fructification |
|---|---|---|---|---|---|
| pH | 7,6 | 7,6 | 7,6 | 7,7 | 7,8 |
| N. total % | 0,26 | 0,26 | 0,26 | 0,25 | 0,25 |
| C. organique % | 1,28 | 1,28 | 1,28 | 1,41 | 1,41 |
| C/N | 4,8 | 4,8 | 4,8 | 5,5 | 5,5 |
| Teneur en eau libre % | 12,05 | 13,2 | 13,2 | 14,2 | 16,5 |

Culture en champ.

Il s'agit d'un limon argilo-sableux.

Tableau II

EVOLUTION CHIMIQUE DES ECHANTILLONS DE SOL
AU COURS DE LA CROISSANCE DU LIN
(culture en champ)

| | Témoin sans plante | Germination | Après germination | Floraison | Fructification |
|---|---|---|---|---|---|
| pH | 6,6 | 6,6 | 6,6 | 6,9 | 6,9 |
| N. total % | 0,17 | 0,17 | 0,17 | 0,17 | 0,18 |
| C. organique % | 1,84 | 1,84 | 1,76 | 1,65 | 1,65 |
| C/N | 10,8 | 10,8 | 10,3 | 9,7 | 9,2 |
| Teneur en eau libre % | 13,2 | 14,8 | 11,2 | 12,8 | 14,06 |

B) ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES ECHANTILLONS DE SOLS.

L'analyse microbiologique envisagée porte sur quatre stades de végétation.

a. Etude de la microflore totale.

Résultats.

Ils sont résumés dans le tableau III.

Tableau III

INFLUENCE DU STADE DE CROISSANCE DU LIN SUR L'EFFET RHIZOSPHERE A L'EGARD DE LA MICROFLORE TOTALE
(nombre de germes par gramme de terre)

| | Germination | | Après germination | | Floraison | | Fructification | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cultures en pots | | R/S | | R/S | | R/S | | R/S |
| Témoin | $70.10^6$ | 1,2 | $80.10^6$ | 16 | $80.10^6$ | 10,5 | $75.10^6$ | 1,4 |
| Rhizosphère | $85.10^6$ | | $1300.10^6$ | | $950.10^6$ | | $100.10^6$ | |
| Cultures en champs | | R/S | | R/S | | R/S | | R/S |
| Témoin | $45.10^6$ | 2,4 | $40.10^6$ | 11,25 | $35.10^6$ | 6,1 | $45.10^6$ | 2,4 |
| Rhizosphère | $110.10^6$ | | $450.10^6$ | | $200.10^6$ | | $110.10^6$ | |

Interprétation et discussion.

On peut voir que le nombre de bactéries varie avec la croissance du végétal. Le maximum se situe un peu avant la floraison. Il est encore très élevé à la floraison mais, à la maturité, le R/S diminue fortement. Ceci confirme les observations de KRASSILNIKOV et coll. (1936) sur le Blé, le Soja, le Tournesol, le Maïs ; de STARKEY (1931) sur plusieurs végétaux.

Si l'on compare ces résultats avec ceux de ZUKOVSKAYA (1941), les coefficients R/S sont bien inférieurs puisque cet auteur trouve des valeurs de l'ordre de 100. LOCHHEAD (1940), utilisant les variétés de Lin Bison et Novelty, obtient un R/S de 4,5 pour la variété Bison (variété résistante à la flétrissure du Lin) et de 28 pour la variété Novelty.

b. Etude des groupes fonctionnels.

Nous avons étudié la fixation de l'azote atmosphérique en aérobiose et en anaérobiose, la protéolyse, la nitrification, la dénitrification, pour le cycle de l'Azote ; l'amylolyse, la cellulolyse pour le cycle du Carbone.

1. Microflore fixatrice.

- Résultats.

Ils sont résumés dans les tableaux IV et V.

Tableau IV

INFLUENCE DU STADE DE CROISSANCE DU LIN SUR L'EFFET RHIZOSPHERE A L'EGARD DES FIXATEURS AEROBIES (Azotobacter)
(nombre de germes par gramme de terre sèche)

| | Germination | | Après germination | | Floraison | | Fructification | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cultures en pots | | R/S | | R/S | | R/S | | R/S |
| Témoin | 130 | 1,3 | 130 | 2,7 | 80 | 1,3 | 120 | 0,1 |
| Rhizosphère | 170 | | 350 | | 110 | | 12 | |
| Cultures en champs | | R/S | | R/S | | R/S | | R/S |
| Témoin | 18 | 1,8 | 14 | 2 | 14 | 0,3 | 28 | 0,1 |
| Rhizosphère | 34 | | 28 | | 4 | | 4 | |

Tableau V

INFLUENCE DU STADE DE CROISSANCE DU LIN SUR L'EFFET RHIZOSPHERE A L'EGARD DES FIXATEURS ANAEROBIES (Clostridium)
(nombre de germes par gramme de terre sèche)

| | Germination | | Après germination | | Floraison | | Fructification | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cultures en pots | | R/S | | R/S | | R/S | | R/S |
| Témoin | 4500 | 2 | 4500 | 3,3 | 1500 | 0,6 | 1500 | 0,6 |
| Rhizosphère | 9500 | | 15000 | | 950 | | 950 | |
| Cultures en champs | | R/S | | R/S | | R/S | | R/S |
| Témoin | 4500 | 1 | 950 | 2,6 | 450 | 2 | 950 | 3,1 |
| Rhizosphère | 4500 | | 2500 | | 950 | | 3000 | |

- Interprétation et discussion.

Si l'on compare le nombre de fixateurs d'azote à la microflore totale, ils ne représentent qu'une infime partie de celle-ci. Les résultats rejoignent ceux de LOCHHEAD et THEXTON (1946), KATZNELSON et STRZELCZYK (1961). Le nombre des Azotobacter étant très faible, même dans le sol témoin, ne peut être considéré qu'avec beaucoup de réserve, la méthode, dans ces conditions, perdant beaucoup de sa sensibilité et de sa fidélité. Cependant, KRASSILNIKOV (1944) note un effet inhibiteur du Lin sur les Azotobacter. Récemment, KATZNELSON et STREZELCZYK (1961), étudiant 15 plantes différentes, montrent des "effets rhizosphère" positifs, nuls ou négatifs suivant l'espèce, le stade de croissance du végétal et le type de sol. Pour le Lin, ils constatent un très faible effet à la germination, qui disparaît à la floraison.

Nos résultats montrent également que l'effet favorable, s'il existe, se situe à la germination, mais devient négatif à la floraison et au flétrissement.

Les Clostridium, plus nombreux, suivent la même évolution que les Azotobacter.

Dans les deux cas, on remarque que le type de sol (à teneur en matière organique différente) n'influence pas les Azotobacter.

Nous pensons que des racines, en général, par leur sécrétion de $CO_2$ plus particulièrement, ne sont pas un habitat favorable pour des Azotobacter sensibles à l'acidité. Nous avons pu constater que les racines de Lin âgées de 15 jours cultivées dans un milieu aqueux gélosé abaissent le pH de 6,9 à 5,2.

D'autre part, un effet de compétition microbienne peut être une des raisons de la faible quantité d'Azotobacter sur les racines. Nous savons que les germes favorisés par "l'effet rhizosphère" sont des germes à croissance rapide utilisant les substances énergétiques immédiatement disponibles qui sont émises par les racines. Les Azotobacter se développant beaucoup plus lentement se trouveraient ainsi éliminés faute de substrat alimentaire. Il a été démontré par exemple que les Pseudomonas, particulièrement stimulés dans la rhizosphère, sont de puissants inhibiteurs des Azotobacter (FEDEROV et TEPPER, 1947).

2. Microflore ammonifiante.

- Résultats.

Ils sont résumés dans les courbes d'activité n° 1 et 2.

- Interprétation et discussion.

Nous voyons que les germes ammonifiants sont stimulés sous l'action des racines de Lin à tous les stades de croissance. Peu net à la germination, l'effet rhizosphère se manifeste surtout 1 mois et demi

INFLUENCE DU STADE DE CROISSANCE DU LIN
SUR L'EFFET RHIZOSPHERE A L'EGARD DE L'AMMONIFICATION

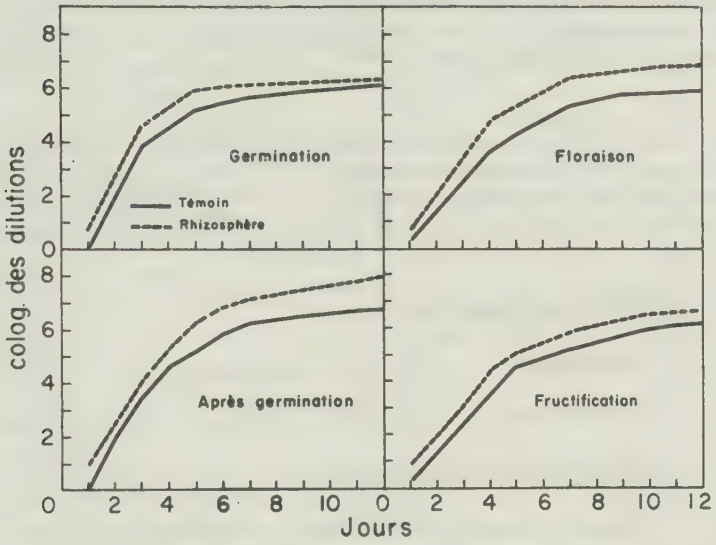



Fig. 1 : AMMONIFICATION (en champ)

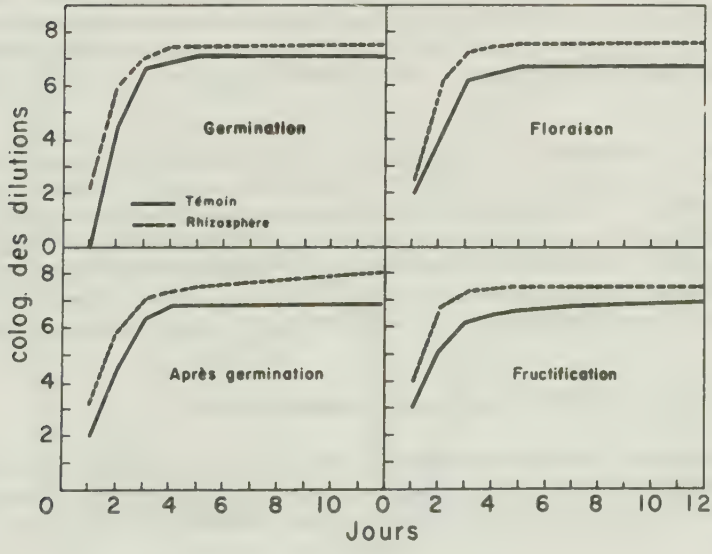



Fig. 2 : AMMONIFICATION (en serre)

après, et, à la floraison. Au flétrissement, il diminue un peu mais est encore très apparent.

D'après les travaux de KRASSILNIKOV et coll. (1936) ; KATZNELSON, ROUATT et PAYNE (1956) ; KATZNELSON (1956) ; RAMBELLI (1959) ; RIVIERE (1959), il semble que les végétaux quels qu'ils soient, stimulent ce groupement physiologique. Seul, le stade d'activité maximum se déplace en fonction de la plante. Par exemple, ce maximum se situe à la maturité pour la Betterave (KATZNELSON, 1946), au tallage pour le Blé (RIVIERE, 1959).

Comme nous le verrons plus loin, cette stimulation n'est pas sans rapport avec la sélection opérée par l'effet rhizosphère ; les germes prédominant sont surtout des Pseudomonadaceae. Ce sont de puissants ammonifiants, il est donc normal que ce groupe bactérien soit particulièrement stimulé.

3. Microflore protéolytique.

- Résultats.

Ils sont résumés dans les courbes d'activité n° 3 et 4.

- Interprétation et discussion.

Comme il fallait s'y attendre la stimulation de la microflore protéolytique suit celle de la microflore ammonifiante. L'activité de la protéolyse est en connexion étroite avec l'ammonification, car elle met en évidence l'action des germes responsables des premiers stades de dégradation des grosses molécules azotées, l'ammonification les derniers termes de cette dégradation. L'effet maximum est toujours situé après la germination mais à la floraison il est beaucoup moins net que l'ammonification.

Les travaux portant sur le dénombrement des bactéries liquéfiant la gélatine (WEST et LOCHHEAD, 1940 ; VAGNEROVA et coll., 1960) sont assez restreints. WEST et LOCHHEAD (1940) signalent que l'espèce végétale influence particulièrement cette stimulation. A l'intérieur d'une même espèce, différentes variétés de Tabac et de Lin "sensible" et "résistant" sont capables d'induire très différemment la stimulation. Par contre, la composition des sols variant dans leur fertilité n'influence aucunement ce groupe.

Ceci est bien en relation avec nos résultats.

MACURA (1959), étudiant l'effet de la fertilisation minérale sur la rhizosphère de la Betterave à sucre, arrive à des conclusions inverses : les types liquéfiant la gélatine sont parmi les plus influencés.

INFLUENCE DU STADE DE CROISSANCE DU LIN
SUR L'EFFET RHIZOSPHERE A L'EGARD DE LA PROTEOLYSE

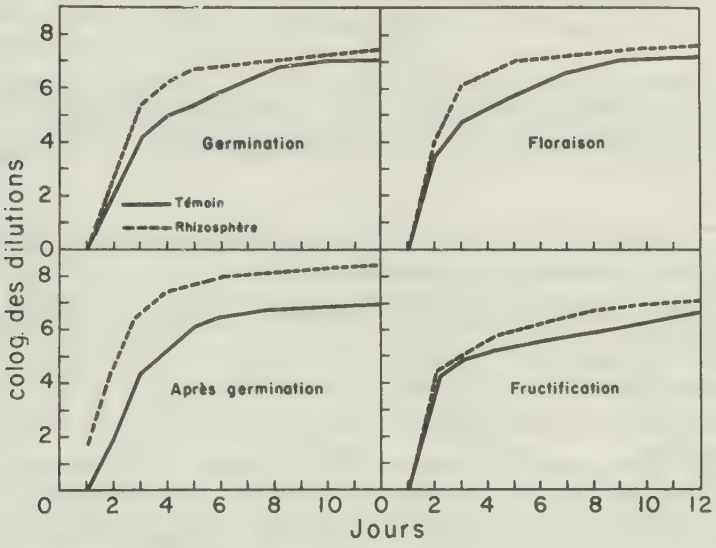



Fig. 3 : PROTEOLYSE (en champ)

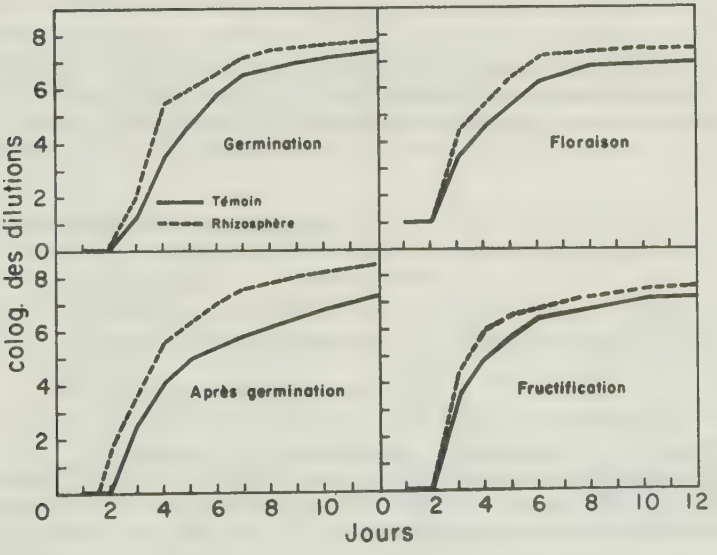



Fig. 4 : PROTEOLYSE (en serre)

4. Microflore nitrificatrice.

- Résultats.

Ils sont résumés dans les tableaux VI et VII.

Tableau VI

INFLUENCE DU STADE DE CROISSANCE DU LIN SUR L'EFFET RHIZOSPHERE A L'EGARD DE LA NITRIFICATION
Germes nitreux (nombre de germes par gramme de terre)

| | Germination | | Après germination | | Floraison | | Fructification | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cultures en pots | | R/S | | R/S | | R/S | | R/S |
| Témoin | 2500 | | 2500 | | 2500 | | 950 | |
| Rhizosphère | 4500 | 1,4 | 9500 | 3,8 | 2500 | 1 | 1700 | 1,8 |
| Cultures en champs | | R/S | | R/S | | R/S | | R/S |
| Témoin | 950 | | 950 | | 450 | | 4500 | |
| Rhizosphère | 1500 | 1,5 | 2000 | 2,1 | 950 | 2 | 12000 | 2,6 |

Tableau VII

INFLUENCE DU STADE DE CROISSANCE DU LIN SUR L'EFFET RHIZOSPHERE A L'EGARD DE LA NITRIFICATION
Germes nitriques (nombre de germes par gramme de terre)

| | Germination | | Après germination | | Floraison | | Fructification | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cultures en pots | | R/S | | R/S | | R/S | | R/S |
| Témoin | 250 | | 450 | | 450 | | 450 | |
| Rhizosphère | 700 | 2,8 | 450 | 1 | 950 | 1 | 450 | 1 |
| Cultures en champs | | R/S | | R/S | | R/S | | R/S |
| Témoin | 250 | | 950 | | 250 | | 250 | |
| Rhizosphère | 450 | 1,4 | 950 | 1 | 450 | 1,8 | 250 | 1 |

- Interprétation et discussion.

Si l'on considère le premier temps du processus de nitrification, c'est-à-dire la transformation de $NH_4^+$ en $NO_2^-$ dont la microflore responsable est la microflore nitreuse, il apparaît que cette flore est faiblement stimulée à tous les stades de végétation en ce qui concerne la rhizosphère en champs mais, en pots, l'effet se manifeste seulement à la germination et à la floraison.

Au deuxième temps, la microflore nitrique oxydant les nitrites en nitrates est moins nombreuse quel que soit le stade de végétation considéré. La stimulation est assez douteuse ; si elle existe, ce n'est qu'à la germination.

Il est difficile d'établir des comparaisons avec les résultats d'autres auteurs qui, eux, ont mesuré la quantité de nitrates près des racines et loin de celles-ci. Ainsi étudiée, la résultante du phénomène de nitrification dépend de l'absorption par la plante d'une partie des nitrates formés par les bactéries et de l'absorption d'une autre partie par les microorganismes hétérotrophes de la rhizosphère. Dans de telles conditions, il est impossible de préciser la rôle des microorganismes nitrificateurs.

Une expérience de STARKEY (1931) montre qu'après addition de $SO^4(NH^4)^2$, la population nitrifiante dans le sol près des racines est capable de transformer l'azote ammoniacal en nitrates plus rapidement que la population d'un sol témoin. Ceci laisse supposer que les éléments nécessaires aux bactéries nitrifiantes sont proportionnellement plus abondants près des racines.

LYON, BIZZELL et WILSON (1923) et WILSON et WILSON (1925) attribuent les variations de concentration en nitrates à la nature des résidus organiques de chaque plante. Si les résidus organiques contiennent des quantités suffisantes d'azote, il y a accumulation de nitrates. Au contraire si les quantités d'azote sont faibles, l'assimilation par les microorganismes hétérotrophes est assez importante pour faire baisser la teneur en nitrate.

5. Microflore dénitrifiante.

- Résultats.

Ils sont résumés par les courbes d'activité n° 5, 6, 7 et 8.

- Interprétation et discussion.

La dénitrification résultant d'une série de transformations successives, il est bien évident que la distribution du nombre et des espèces bactériennes sera fort variable suivant le stade de dégradation considéré.

La classification la plus communément admise est celle de WAKSMAN (1932), qui répartit les bactéries réductrices en trois groupes :

INFLUENCE DU STADE DE CROISSANCE DU LIN
SUR L'EFFET RHIZOSPHERE A L'EGARD DE LA DENITRIFICATION

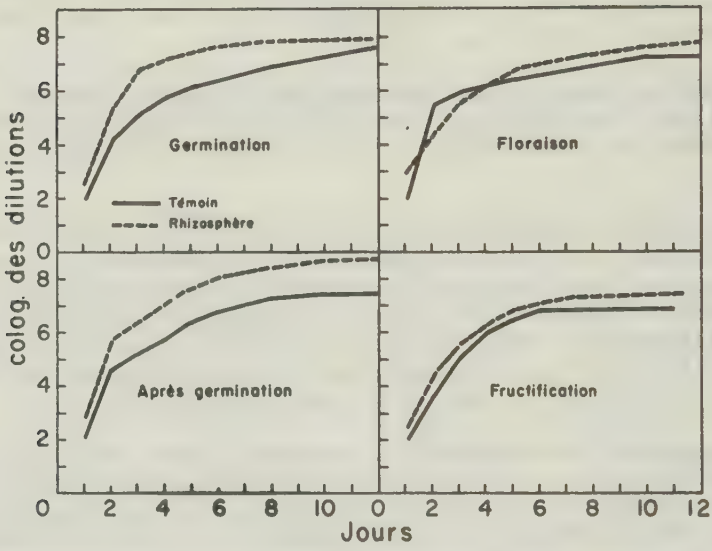



Fig. 5 : DENITRIFICATION (en champ) : apparition des nitrites.

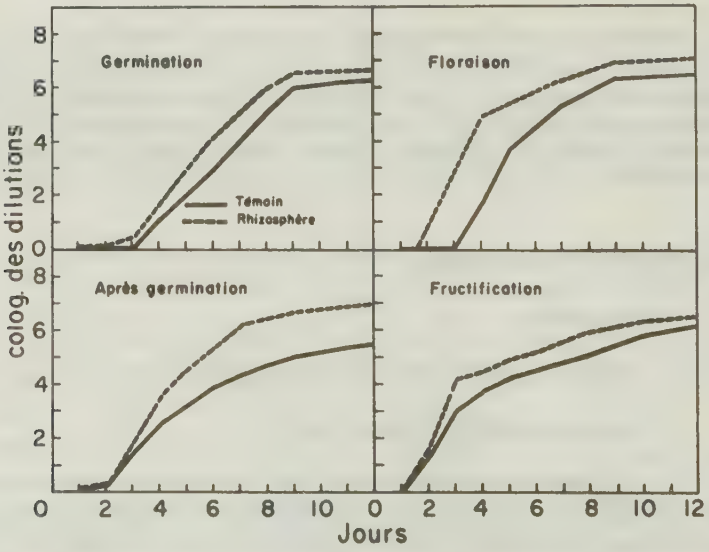



Fig. 6 : DENITRIFICATION (en champ) : disparition des nitrates.

INFLUENCE DU STADE DE CROISSANCE DU LIN
SUR L'EFFET RHIZOSPHERE A L'EGARD DE LA DENITRIFICATION

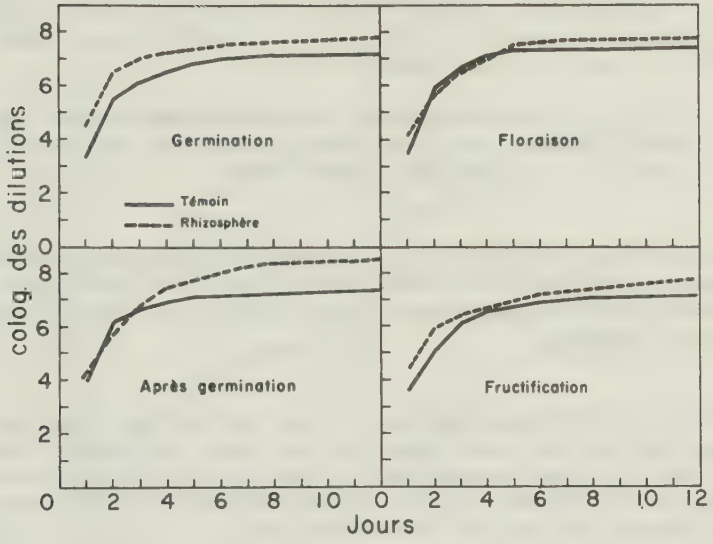



Fig. 7 : DENITRIFICATION (en serre) : apparition des nitrites.

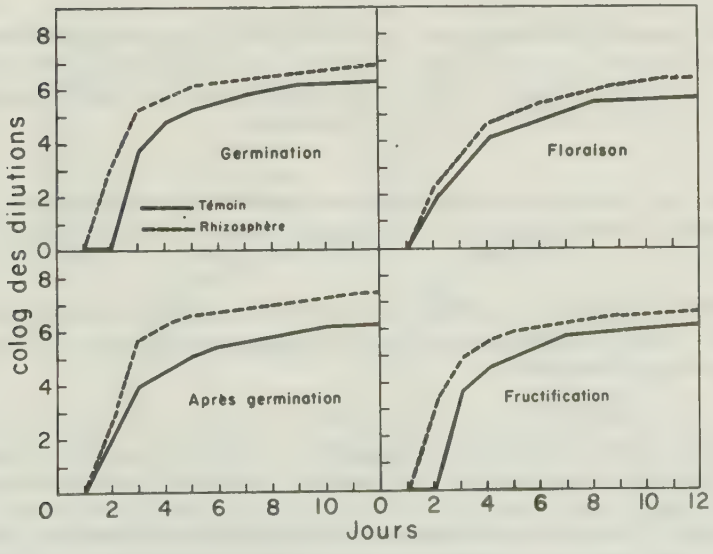



Fig. 8 : DENITRIFICATION (en serre) : disparition des nitrates.

1) Bactéries capables de réduire des nitrates en nitrites. Ce groupe comprend un très grand nombre d'espèces les plus variées, car rares sont les bactéries ne pouvant accomplir cette première réaction.

2) Bactéries capables d'utiliser les nitrites pour les réduire en $NH_3$. Ce groupe, aussi très vaste, comprend pratiquement toutes les espèces de la microflore ammonifiante.

3) Bactéries réduisant les nitrates en azote gazeux. Contrairement aux deux premiers, ce groupe comprend un très petit nombre de bactéries à espèces rares (4 %, MAASSEN, 1906).

Les tests utilisés pour la mise en évidence de la dénitrification étant, pour le plus grand nombre de travaux, soit la formation des nitrites, soit la formation de $NH_3$, la microflore étudiée ici sera celle constituant les deux premiers groupes.

Que l'on considère l'apparition des nitrites, ou la disparition des nitrates, (l'apparition de $NH_3$, stade fugace du fait de sa réutilisation immédiate par de nombreux microorganismes, ne peut être facilement mise en évidence), les courbes d'activité que nous avons obtenues montrent une stimulation de la dénitrification sous l'effet rhizosphère, à tous les stades de végétation. Assez nette à la germination, cette stimulation atteint son maximum 1 mois 1/2 après germination. A la floraison et au flétrissement, elle diminue considérablement.

Si l'on n'envisage que les deux premiers groupes de WAKSMANN, il n'est pas étonnant que les germes, capables tout au moins de réduire les nitrates en nitrites, soient, avec les ammonifiants, les plus fréquemment stimulés, souvent ces deux flores se confondent.

D'après les résultats de la littérature, cette stimulation est en relation avec l'espèce, le stade de croissance de la plante et le type de sol.

TIMONIN et THEXTON (1950), STRZELCZYK (1961) trouvent des effets stimulants, mais variables dans leur intensité, sur le Radis, le Blé, tandis que l'Oignon ne réagit pas.

RIVIERE (1959), étudiant le phénomène sur le Blé, note une stimulation à la germination, au tallage et à l'épiaison, avec effet maximum au moment du tallage, alors que KATZNELSON (1946), sur la Betterave, situe son maximum à la maturité. KING et WALLACE (1956) trouvent que les bactéries réduisant les nitrates sont plus nombreuses dans la rhizosphère de jeunes plantules.

INFLUENCE DU STADE DE CROISSANCE DU LIN
SUR L'EFFET RHIZOSPHERE A L'EGARD DE L'AMYLOLYSE

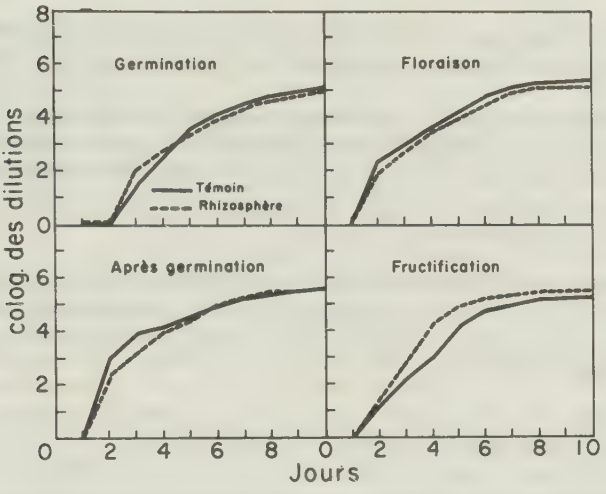



Fig. 9 : AMYLOLYSE (en champ)

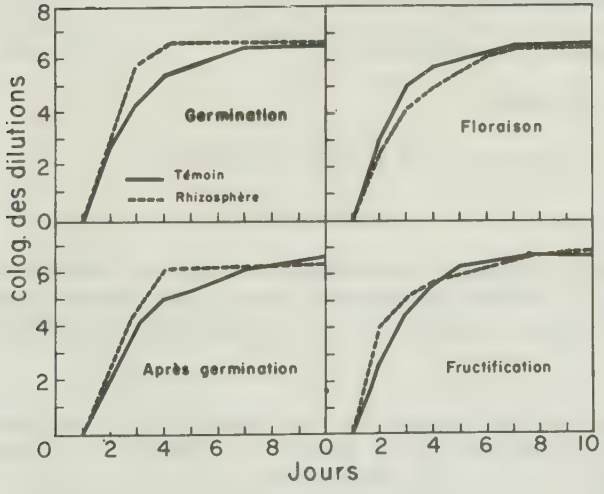



Fig. 10 : AMYLOLYSE (en serre)

6. Microflore amylolytique.

- Résultats.

Ils sont résumés dans les courbes d'activité n° 9 et 10.

- Interprétation et discussion.

Quel que soit le stade de culture, l'effet rhizosphère est nul sur la microflore amylolytique ; cependant, on ne peut parler d'inhibition.

Bien que l'amidon se trouve fréquemment dans le tissu végétal, il y a peu de travaux sur l'amylolyse. KING et WALLACE (1956) signalent un pourcentage moins élevé de bactéries hydrolysant l'amidon dans la rhizosphère de l'avoine que dans le sol témoin, aussi bien sur de jeunes plantules que sur celles à maturité.

ROUATT (1959), au contraire, trouve une très forte stimulation de ces bactéries aux premiers jours de germination : 3 jours après la germination le R/S des bactéries isolées capables d'hydrolyser l'amidon est de 10, au 10e jour le R/S est de 100.

RIVIERE (1959), étudiant l'effet rhizosphère du Blé en fonction du temps le trouve toujours stimulant.

Il semble bien que l'amylolyse soit un phénomène particulier lié à la nature du végétal ; cependant, nos expériences ont montré que la présence de sécrétions radicellaires ne peut à elle seule, inhiber la culture de germes amylolytiques isolés de la rhizosphère.

7. Microflore cellulolytique.

- Résultats.

Ils sont résumés dans le tableau VIII

Tableau VIII

INFLUENCE DU STADE DE CROISSANCE DU LIN SUR L'EFFET RHIZOSPHERE A L'EGARD DE LA CELLULOLYSE. Cellulolytiques aérobies (pourcentage des grains de terre entourés d'une culture)

| | Germination | | Après germination | | Floraison | | Fructification | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cultures en champs | | R/S | | R/S | | R/S | | R/S |
| Témoin | 24 | | 36 | | 24 | | 52 | |
| Rhizosphère | 60 | 2,5 | 64 | 1,7 | 60 | 2,5 | 88 | 1,6 |

- Interprétation et discussion.

Il n'a pas été possible d'effectuer un dénombrement dans les cultures en pots, tous les grains de terre des boîtes "terre témoin" donnant déjà une réponse positive.

En champ, les microorganismes cellulolytiques semblent légèrement stimulés à tous les stades de végétation. Ici, les résultats ne peuvent être interprétés avec rigueur, car cette technique ne fournit qu'une idée très approximative du nombre et de la répartition qualitative. Il faut en effet admettre que chaque grain de terre donne naissance à une colonie bactérienne et de même type (voir p.11 ).

On note également une prolifération préférentielle de zones jaunes très extensives autour des grains de la terre soumise à l'action des racines. L'examen microscopique révèle la présence de germes arqués, mobiles répondant à la morphologie des Cellvibrio.

Les colonies visqueuses jaune-orange décrites sous le genre Cytophaga sont plus nombreuses dans la "terre témoin".

Plusieurs travaux (KATZNELSON (1946) mentionnent une stimulation à la maturité, c'est-à-dire à la période de décomposition des racines. KRASSILNIKOV (1936) signale un accroissement au début de la croissance et au stade de la maturité. RIVIERE (1959) note au contraire une inhibition. Nous pensons que de si grandes différences entre les résultats proviennent en partie des difficultés rencontrées dans les techniques, qui, quelles qu'elles soient, ne peuvent donner qu'un renseignement approximatif sur le dénombrement.

## CONCLUSIONS A LA PREMIERE PARTIE

Les résultats d'ensemble de cette première partie font ressortir :

1°) "L'effet rhizosphère" du Lin, cultivé en champs et en pots, se traduit par une augmentation de la microflore bactérienne totale. Cette augmentation se répartit principalement parmi les groupes fonctionnels suivants : ammonification, dénitrification, protéolyse. Pour la fixation d'azote atmosphérique, la nitrification, la cellulolyse, elle est discutable ; si l'on prend pour limites de signification celles des tables de COCHRAN, appliquées aux méthodes statistiques en microbiologie par STERMAN (1955), elles varient entre 0,33 et 3,30. Un R/S ne sera donc significatif que s'il est supérieur à 3,30 ou inférieur à 0,33. En tenant compte de ces calculs, la stimulation de ces trois derniers groupes devient douteuse. Elle est nulle pour l'amylolyse.

Ceci nous conduit à penser que la stimulation, sous l'action du système radicellaire du Lin, porte essentiellement sur les flores polyphages du sol, celles appelées par WINOGRADSKY "flores zymogènes" réagissant à toute introduction de substances facilement métabolisables.

Comme nous l'avons démontré, ce sont ces germes à activité polyvalente qui entrent dans les groupes fonctionnels stimulés. Le mécanisme de cette stimulation sera étudié dans la IIe Partie, mais nous pouvons dire ici que, sous l'action des sécrétions radicellaires, ces microorganismes disposent de substances immédiatement utilisables, telles que acides aminés, facteurs de croissance, vitamines, etc. Il est donc assez normal, dans ce milieu particulièrement favorable, qu'ils prennent le pas sur des germes (Azotobacter, nitrificateurs) qui, d'une part, ont une croissance beaucoup plus lente, d'autre part, ne rencontrent pas spécialement (tout au moins en ce qui concerne les Azotobacter) au contact des racines les conditions indispensables à leur développement.

L'aspect de la pente des courbes nous montre également que "l'effet rhizosphère" se traduit en outre par une augmentation de l'activité physiologique des groupements stimulés.

2°) "L'effet rhizosphère" est lié au stade de développement du Lin. Faible à la germination, il est maximum un peu avant la floraison, se maintient ou décroît légèrement, selon les groupes, à la floraison ; au flétrissement, il est presque inapparent.

3°) Les deux terres utilisées présentent deux caractères distinctifs : les valeurs du pH et du rapport C/N, caractères que l'on pouvait penser à priori les plus susceptibles d'influencer "l'effet rhizosphère" ; or, celui-ci se manifeste sur les mêmes groupes fonctionnels et aux mêmes stades de croissance dans les deux terres. Il semble donc peu probable que la nature du sol détermine la spécificité de "l'effet rhizosphère", mais au contraire que cette spécificité soit bien liée au Lin lui-même et en particulier, comme nous le verrons dans la dernière partie de cette étude, à ses sécrétions radicellaires.

# DEUXIEME PARTIE

## ETUDE MICROBIOLOGIQUE DE LA RHIZOSPHERE DU LIN EN CULTURE HYDROPONIQUE

Dans cette seconde partie, nous avons tenté de créer un "effet rhizosphère" en culture hydroponique. La suite de nos recherches nous amenant à préciser le rôle des sécrétions radicellaires du Lin, vis-à-vis de la microflore tellurique, il était nécessaire de reproduire dans des conditions contrôlées, le phénomène global résultant des interrelations entre la plante et les microorganismes, c'est-à-dire une rhizosphère expérimentale.

Eliminant les effets liés à la structure de la terre, nous avons comparé quelques résultats obtenus dans ces conditions sur les principaux groupes fonctionnels, à ceux déjà trouvés dans le sol.

Le premier chapitre traitera des données bibliographiques concernant les cultures en conditions axéniques. Nous exposerons ensuite des recherches personnelles sur la mise au point et l'adaptation de la technique hydroponique à notre travail, ainsi que les résultats expérimentaux obtenus avec cette méthode.

Le deuxième chapitre sera consacré à une étude détaillée de l'effet des sécrétions radicellaires sur les bactéries de la graine d'une part, les bactéries telluriques d'autre part et enfin sur les bactéries de la graine et du sol en association.

Après isolement des bactéries appartenant à chacun de ces groupes, nous procéderons à leur identification morphologique, puis étudierons leur rôle physiologique dans la rhizosphère.

Chapitre IV

# TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES EN CULTURE HYDROPONIQUE

## 1. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

### A. LES TECHNIQUES.

"La culture hydroponique ou aquiculture est le procédé par lequel des plantes peuvent être cultivées avec les racines plongeant dans une solution nutritive" (HOMES, 1963).

Les premières cultures sur milieux essentiellement liquides furent réalisées vers 1860, par KNOP d'une part, par SACHS d'autre part ; les formules des solutions nutritives composées par ces deux chercheurs sont encore en usage.

Ce procédé, consacré jusqu'alors à des recherches d'ordre scientifique, fut en 1935 utilisé par W. F. GERICKE aux Etats-Unis qui l'orienta vers des fins pratiques. Il en publia les grands principes et donna à ses réalisations le nom "d'hydroponics".

Au laboratoire, le domaine d'utilisation de la culture hydroponique est vaste. Chaque fois que l'on désire cultiver des plantes dans des conditions déterminées, c'est à cette méthode ou une de ces variantes (culture sur sable arrosé de solution nutritive) que l'on fait appel. De nombreuses études, qui sortent du cadre de ce travail, concernant la nutrition des végétaux, pourraient fournir des exemples.

Une autre possibilité, celle de permettre la culture de la plante en milieu stérile, l'introduisait dans l'étude de certains processus physiologiques, particulièrement dans ceux où l'action des microorganismes retentit sur la vie des plantes.

La culture en milieu aseptique ou "axenic technique", selon la terminologie de BAKER et FERGUSON (1942), fut surtout utilisée pour rechercher la nature des sécrétions radicellaires et préciser ensuite leur action à l'égard de la microflore tellurique.

Les techniques varient dans leur complexité suivant la taille du végétal et son degré de croissance. La plus grande partie des travaux se situant au moment du stade germinatif, les auteurs (LYON et WILSON, 1921 ;

ROVIRA (1951) ont adopté des méthodes simples. De larges tubes de verre ou flacons similaires contiennent le substrat minéral approprié à la culture du végétal. Après bouchage au coton les tubes sont stérilisés à l'autoclave. Des graines désinfectées y sont ensuite introduites. On obtient ainsi des plantules stériles permettant d'étudier tout au moins le premier stade de croissance. L'avantage de cette technique est que le taux de contamination y est très faible.

Pour des expériences nécessitant un stade plus avancé du végétal (floraison, maturité), on doit recourir à des dispositifs beaucoup plus complexes. De tels procédés ont été décrits notamment par COMBES (1917), GERRETSEN (1935), REUSZER (1950), RIVIERE (1959), STOTZKY et coll. (1961). Généralement, les racines seules se trouvent en conditions axéniques, le reste de la plante se développe à l'air libre.

Dans le domaine microbiologique, le rôle des sécrétions radicellaires sur les microorganismes et, inversement celui des microorganismes sur les racines, a pu ainsi être démontré plus clairement.

## B. L'ACTION DES SECRETIONS RADICELLAIRES SUR LES MICRO-ORGANISMES.

L'action des sécrétions radicellaires sur des souches bactériennes connues allait permettre de déceler des effets d'inhibition et de stimulation.

### a) Effets d'inhibition.

DASTE (1950), dans des conditions semi-aseptiques, montre que les racines de Blé inhibent la croissance des Azotobacter.

STOLP (1952) provoque l'inhibition d'une souche bactérienne inoculée dans un milieu gélosé, quand il fait germer des graines à la surface de la gélose. Malheureusement, les conditions de culture (aération, structure) qui s'écartent des conditions naturelles, provoquent un ralentissement de l'élongation des racines. Cette méthode n'est pas non plus applicable à l'étude des substances formées par la plante adulte. Aussi, METZ (1955) préfère disposer de fragments de racines prélevés à différents stades de croissance, il dépose ceux-ci sur des plaques inoculées avec Bacillus subtilis non identifié reconnu très sensible à l'action radicellaire. Les résultats montrent que, suivant les espèces végétales, les racines ont une action inhibitrice forte, moyenne, très faible ou nulle. Le plus grand nombre des plantes, dont Linum usitatissinum se classent dans les groupes à activité faible ou nulle. L'auteur note aussi, avec des résultats assez variables, que les racines de plantes ne sont pas toxiques pour les bactéries isolées de la rhizosphère de cette même plante mais, le sont très souvent pour des bactéries isolées de racines d'autres plantes et du sol.

ROUATT et KATZNELSON (1957) se servant d'extraits radicellaires d'Avoine cultivée stérilement, montrent que ceux-ci peuvent inhiber la prolifération de bactéries isolées de la rhizosphère de diverses plantes.

b) Effets de stimulation.

Les propriétés stimulantes de la plante sur les microorganismes ont déjà été révélées dans les conditions naturelles ; on pouvait supposer que les sécrétions radicellaires ne sont pas la seule cause de stimulation mais, que des facteurs propres au sol y prennent part aussi.

L'utilisation de sécrétions de plantes cultivées aseptiquement va permettre de mieux préciser le phénomène.

WEST (1939) démontre que les excrétions racinaires du Lin peuvent suppléer aux besoins en thiamine et biotine de Micrococcus aureus et Rhizobium trifolii.

MESHKOV et KHODOKOVA (1954) trouvent que la présence d'exsudats de racines de Pois et de Maïs favorisent le développement des bactéries non sporulées et que le degré de stimulation varie avec l'espèce microbienne et la nature de l'exsudat. Les excrétions de racines de Pois sont plus favorables aux Azotobacter que celle de Maïs.

ROVIRA (1956), en ajoutant des excrétions de racines à un milieu synthétique, provoque une stimulation plus marquée des organismes de la rhizosphère que de ceux du sol. Il constate aussi que cette action stimulante n'est pas toujours remplaçable par l'adjonction au milieu d'acides aminés, d'extrait de sol ou de divers facteurs de croissance.

VERONA (1958), PICCI (1959) affirment que, dès la phase d'imbibition, les graines libèrent des substances stimulatrices des bactéries ; vitamines et facteurs de croissance ont été mis en évidence.

## C. L'ACTION DES MICROORGANISMES SUR LES RACINES.

En dehors des bactéries pathogènes et symbiotiques la pénétration des microorganismes à l'intérieur du tissu végétal reste obscure. Certains travaux de RUSSEL (1892), SANFORD (1948), TERVET et HOLLIS (1948) mentionnent la présence de bactéries dans des organes autres que les racines de plantes apparemment saines. La présence de ces bactéries n'a jusqu'alors pas trouvé de signification.

L'utilisation des antibiotiques a prouvé que la plante assimile des molécules organiques (WINTER, 1952 ; KRASSILNIKOV, 1954) ; aussi, l'influence des produits d'élimination des microorganismes de la rhizosphère sur le métabolisme de la plante doit-elle être étudiée avec intérêt. Il est fort à penser que ce sont des phénomènes d'absorption de molécules organiques au niveau des racines qui peuvent modifier le développement du végétal.

A plusieurs reprises, BUKATSCH et coll. (1956), POCHON et de BARJAC (1958), VANCURA et MACURA (1960), CHALVIGNAC (1962), ont observé que des cultures d'Azotobacter, ou un filtrat de culture, modifient le caractère morphologique des racines (Blé, Maïs, Lin) cultivées dans des conditions aseptiques sur un milieu liquide ou gélosé. Il se produit un raccourcissement intense en même temps qu'un épaississement du système

radiculaire. Ce phénomène amène les auteurs à penser qu'il s'agit de la libération par les Azotobacter d'une substance de type auxinique à des concentrations excessives. De fait, VANCURA et MACURA (1961) ont pu mettre en évidence des produits indoliques.

Malheureusement, ces auteurs n'ont pas recherché si ces phénomènes pouvaient exercer un effet sur le métabolisme de la plante.

De plus, dans ces études, les conditions de culture des microorganismes sont si différentes de celles de la rhizosphère qu'elles suggèrent, plutôt qu'elles ne prouvent, que les produits d'élimination des microorganismes affectent les racines.

Une suite d'expériences de KRASSILNIKOV de 1941 à 1961, a apporté quelques éclaircissements sur le rôle des bactéries du sol dans la nutrition des plantes. Cet auteur en déduit que les métabolites microbiens peuvent avoir des effets stimulants, telles les gibberellines, ou des effets dépressifs, c'est le cas de toxines et substances antibiotiques synthétisées par certaines bactéries. Les germes peuvent aussi synthétiser des composés organiques variés, qui, absorbés par la plante, sont utilisés comme source additionnelle de nourriture.

De toutes ces études, il ressort que la culture hydroponique axénique, en séparant l'action de la plante de celle des microorganismes, a permis de mettre en évidence et de préciser leur rôle respectif dans la rhizosphère. Des effets d'inhibition et de stimulation, seulement supposés en conditions naturelles, ont pu être confirmés comme étant indépendants des conditions physiologiques du sol. Inversement, cette technique, en donnant la possibilité de contrôle d'une part, des réactions de la plante sur les microorganismes, et d'autre part des microorganismes sur la plante, permet de créer une rhizosphère "artificielle" et ainsi de saisir les interractions de ce phénomène.

## D. LES RHIZOSPHERES ARTIFICIELLES.

L'établissement d'une rhizosphère expérimentale fut envisagé d'abord par TIMONIN (1947) en enfouissant des sacs de collodion contenant des racines de Lin. Il constate une augmentation des bactéries dans la zone entourant les sacs de collodion. Cette méthode ne peut être retenue lorsque l'on désire étudier des échanges de population. ROVIRA (1956) eut l'idée d'incorporer à de la terre séchée à l'air, l'eau de lavage d'un sable dans lequel des pois avaient été cultivés en conditions stériles. La terre ainsi traitée est mise à incuber à 28° dans un récipient ouvert à l'air libre. Journellement, la teneur en eau libre est maintenue par arrosage de la terre avec la solution d'exsudat. Le traitement est poursuivi pendant 21 jours. Parallèlement, de la terre traitée avec la solution minérale ne contenant pas d'exsudat radicellaire sert de témoin.

Sur les données de ROVIRA (1956), RIVIERE (1959) réalise à son tour une rhizosphère artificielle plus complète que celle de ROVIRA en ce sens qu'il réussit à maintenir, en conditions aseptiques des racines de blé, jusqu'au stade du tallage. Il incorpore ensuite la solution d'excrétion

concentrée à du limon argileux préalablement séché. "L'effet rhizosphère" se manifeste après 4 jours et atteint sa valeur maximum au 17e jour dans le cas de la microflore totale. Les microflores des groupes fonctionnels évoluent comme ceux de la rhizosphère en conditions naturelles.

Les résultats de cette expérimentation montrent que les microorganismes du sol ont réagi à l'addition des sécrétions radicellaires. Cependant, il est douteux que les bactéries trouvent à un moment donné tous les composés organiques accumulés dans le milieu depuis la germination de la plante. On peut en effet supposer qu'au fur et à mesure de l'élimination par les racines de substances utilisables, celles-ci se trouvent immédiatement assimilées et métabolisées par les germes à croissance rapide de la rhizosphère ; ces derniers peuvent alors se multiplier ; à leur tour, ils lâchent dans le milieu leurs produits de catabolisme qui sont repris par d'autres germes comme substrat alimentaire.

Ainsi, nous pensons que la rhizosphère est un milieu en perpétuel changement où les réactions microbiennes s'enchaînent, cet enchaînement dépendant de la quantité de substances assimilables au départ. C'est pourquoi nous avons cherché une méthode qui respecte au mieux les relations du complexe "plante-microorganismes" existant dans la rhizosphère naturelle.

## 2. LA CULTURE HYDROPONIQUE

La culture hydroponique est la méthode qui nous a semblé le mieux répondre à cette partie de notre travail, dont le but est de provoquer un "effet rhizosphère" lié essentiellement à l'action des exsudats radicellaires sur la microflore tellurique en éliminant au maximum l'influence de la terre elle-même.

### A. TECHNIQUE EXPERIMENTALE ADOPTEE.

a) Principe de la méthode :

La plante est cultivée sur un milieu minéral liquide de composition définie, en présence de la microflore d'une terre donnée. Au cours de la croissance, il se fait une sélection qualitative et quantitative des espèces les mieux adaptées aux sécrétions radicellaires. Ces modifications sont mises en évidence par l'analyse des groupements fonctionnels et le dénombrement de la microflore totale.

b) Matériel :

On utilise des tubes de verre de Pyrex de 20 cm x 3 cm dans lesquels on introduit 20 ml d'une solution minérale adaptée à la culture du végétal.

Dans le cas du Lin, nous nous sommes servis de la solution de

BORNER et RODEMACHER (1957) :

| | | |
|---|---|---|
| $Ca(NO_3)_2$ | | 0,5 g |
| $KNO_3$ | | 0,2 g |
| $KH_2PO_4$ | | 0,2 g |
| $MgSO_4, 7H_2O$ | | 0,25 g |
| $FeSO_4$ | | 0,04 g |
| $MnCl_2, 4H_2O$ | | 0,005 g |
| $BO_3H_2$ | | 0,002 g |
| Oligo-éléments | | 1 ml |
| Eau distillée | Q. S. | 1000 ml |

Une mince couche de laine de verre destinée à supporter les graines est placée à deux ou trois millimètres au-dessus du niveau du liquide et non dans celui-ci. De cette façon, le pH du milieu ajusté à 6,8 ne risque pas d'être modifié par un apport d'ions abandonnés par la laine de verre. Après bouchage au coton, on stérilise le dispositif 20 minutes à 110° à l'autoclave.

c) Désinfection des graines.

Les graines de Lin étant souvent infestées par des spores de champignons difficiles à détruire, il est nécessaire d'avoir recours à un agent stérilisant assez puissant.

Au début de cette étude, nous avons utilisé comme un très grand nombre d'auteurs, le bichlorure de mercure en solution à 1 p. mille. Malgré les résultats satisfaisants du point de vue de la désinfection, nous avons dû l'abandonner, une certaine inhibition se révèlant lors de la germination des graines. Il s'agit là d'une cause d'erreur très importante jamais relevée semble-t-il. Il nous paraît intéressant de signaler, ici, quelques expériences personnelles qui nous ont permis d'arriver à ces conclusions.

La désinfection a été pratiquée de la façon suivante :

Une vingtaine de graines de Lin sont trempées successivement dans les bains suivants :

| | |
|---|---|
| Teepol à 5 % | 10 minutes |
| Alcool à 90 % | 5 minutes |
| $HgCl_2$ à 1 p. mille | 6 minutes |

suivis de 10 lavages dans l'eau distillée stérile.

Première expérience : les graines traitées sont déposées sur des boîtes de gélose nutritive stérile ensemencée au préalable : un premier lot par un Rhizobium, un second par un Staphylocoque et un troisième par des dilutions de terre de $10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$ et $10^{-4}$. On dépose une graine au centre de chaque boîte et on répète l'expérience en triple.

Après 3 jours de culture à 28°, on constate l'apparition d'une zone inhibitrice de trois centimètres de diamètre environ autour de la graine. Dans le cas des boîtes ensemencées avec les dilutions de terre $10^{-1}$ et $10^{-2}$, la

zone d'inhibition est nettement apparente mais cependant on constate les jours suivants une maigre prolifération de colonies microbiennes.

Nous avons pensé qu'il s'agissait de lavages insuffisamment prolongés pour éliminer le bichlorure de mercure.

Deuxième expérience : les graines sont traitées comme précédemment mais en les laissant séjourner 24 heures dans la seconde eau de lavage. Après ce temps de contact, on continue les rinçages stérilement et on termine l'expérience en utilisant comme souche test le Rhizobium qui semble le plus sensible à l'action mercurielle.

Les résultats montrent que ces traitements n'évitent pas l'apparition de la zone inhibitrice. Quelques gouttes d'eau de lavage de contact de 24 h. prélevées et déposées sur une boîte ensemencée ne provoquent aucune inhibition.

Les lavages prolongés ne modifient donc pas le comportement des graines vis-à-vis de la culture bactérienne, ce qui laisse penser que le $HgCl_2$ est bien retenu par la graine.

Troisième expérience : cette dernière expérience nous a montré que si l'on soumet des graines traitées à l'autoclavage pour détruire leur pouvoir de germination aucune inhibition n'est décelée autour de ces graines.

On peut conclure que le Hg est retenu à la surface de la graine et ne peut être libéré que lors de la germination.

Des expériences avec du mercure radioactif,* nous ont permis d'affirmer que l'ion Hg était bien la cause de cette inhibition. On peut supposer que cette forte fixation à la graine pouvait être due à un complexe de chélation entre les protéines de la graine et le mercure. On conçoit alors que les altérations tégumentaires qui se produisent à la germination entraînent la libération de Hg déterminant alors la zone d'inhibition.

L'hypochlorite de Calcium, sans influence sur la flore bactérienne, a finalement été adopté.

La désinfection des graines se pratique de la façon suivante : apres triage soigneux des graines apparemment saines (enveloppe non tachée, aspect brillant), celles-ci sont traitées par :

| | |
|---|---|
| Teepol à 5 % | 10 minutes |
| Alcool à 90° | 5 minutes |
| Hypochlorite de Ca à 7 % filtré | 20 minutes |

on lave ensuite 5 fois avec de l'eau distillée stérile.

d) Mise en culture.

On prélève stérilement à l'aide d'une pipette Pasteur non étirée cinq

* Nous tenons à remercier Monsieur le Docteur BESCOL-LIVERSAC d'avoir bien voulu diriger cette expérimentation.

graines que l'on dépose sur la couche de laine de verre humidifiée lors de la stérilisation à l'autoclave.

Dix tubes sont ainsi mis en culture.

e) Ensemencement du milieu.

Chaque tube ainsi préparé reçoit 2 ml d'une suspension-dilution de la terre de Versailles à $10^{-3}$. A cette dilution, on peut penser que la variété des espèces telluriques est respectée et que les "facteurs physiques et chimiques" de la terre ont un effet négligeable. De telles conditions nous conduisent à un "effet rhizosphère" caractéristique de l'exsudat de la plante, quasi indépendant de la terre.

Les témoins de même composition ne reçoivent pas de graines.

Les tubes, entourés de papier noir jusqu'au niveau de la laine de verre, sont portés à l'étuve à 28°, à l'obscurité, pendant 48 heures pour faciliter la germination. La culture est ensuite continuée dans une serre soumise aux variations climatiques et thermiques de l'extérieur. Cette culture a été entreprise le 21 Mai et terminée le 16 Juin 1960.

f) Aération de la culture.

Nous avons utilisé un des procédés préconisés par CHOUARD (1952) : l'émersion partielle mais permanente de la base des racines. Dès que les racines ont environ 1,5 cm de longueur, on remonte progressivement le support à l'aide de pinces stériles de façon à avoir une portion de racines de 1 cm en atmosphère humide mais non immergée. Ceci est nécessaire pour permettre la formation des poils absorbants. Trois fois par semaine, on complètera cette aération par quelques tapotements sur la base du tube.

g) Inconvénients de la méthode.

Cette technique, simple d'exécution, a cependant le désavantage de ne pouvoir pousser le stade de développement de la plantule au delà d'un mois. Une autre critique peut être avancée, celle de soumettre la population microbienne à une vie aquatique. Toutefois, ARNANDI (1961), isolant des germes d'une culture hydroponique, rencontre une nette prédominance de schizomycetes appartenant aux genres Flavobacterium et Pseudomonas, genres le plus fréquemment signalés dans la rhizosphère naturelle. On peut donc penser que les germes réagissant à l'effet rhizosphère en milieu hydroponique s'apparentent à ceux de la rhizosphère en terre.

B. ANALYSE MICROBIOLOGIQUE.

a) Prélèvement des échantillons.

Après trois semaines de végétation, les racines des plantules se sont développées dans le milieu en y lâchant leurs produits d'excrétion, eux-mêmes utilisés par la microflore présente.

Les plantules et leurs racines sont alors éliminées et le liquide de tous les tubes mélangé le plus intimement possible par une agitation de 5 minutes à l'agitateur mécanique.

Les milieux des tubes témoins sont traités de la même manière.

b) Réalisation des dilutions.

5 ml prélevés stérilement de chacun des deux échantillons obtenus sont ajoutés à 45 ml d'eau stérile ; on réalise ainsi la dilution $10^{-1}$, on effectue ensuite une série décimale de dilutions jusqu'à $10^{-9}$, dans les conditions déjà précisées (voir p. 14 ).

c) Appréciation de la microflore totale.

Le dénombrement de la microflore totale est déterminé par la méthode en milieu liquide à l'extrait de sol. Les résultats sont exprimés en nombre de germes par millilitre de milieu.

d) Mise en évidence des groupements fonctionnels du cycle de l'Azote et du Carbone.

A l'aide des dilutions de terre, les milieux électifs appropriés sont ensemencés pour mettre en évidence les principaux groupes fonctionnels à savoir : l'ammonification, la dénitrification, la protéolyse pour le cycle de l'Azote, l'amylolyse pour le cycle du Carbone.

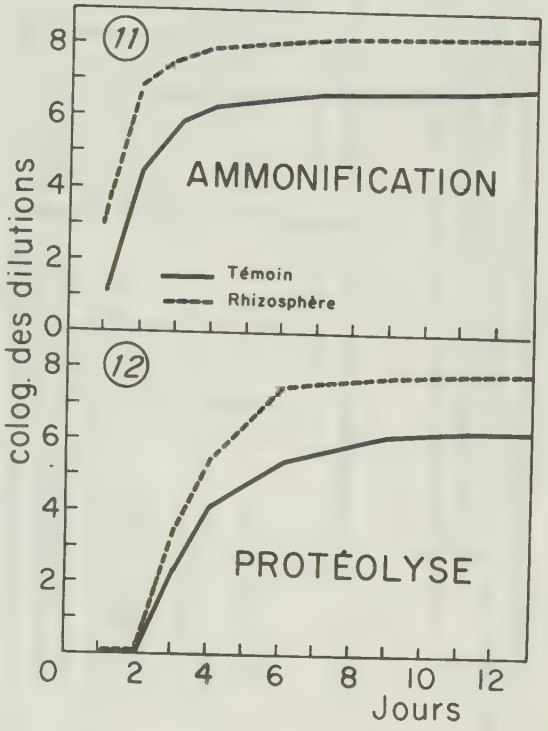
Pour la fixation de l'Azote et la nitrification dont les représentants sont beaucoup moins nombreux dans le sol, l'expérimentation a été refaite en ensemençant avec une dilution de terre à $10^{-1}$.

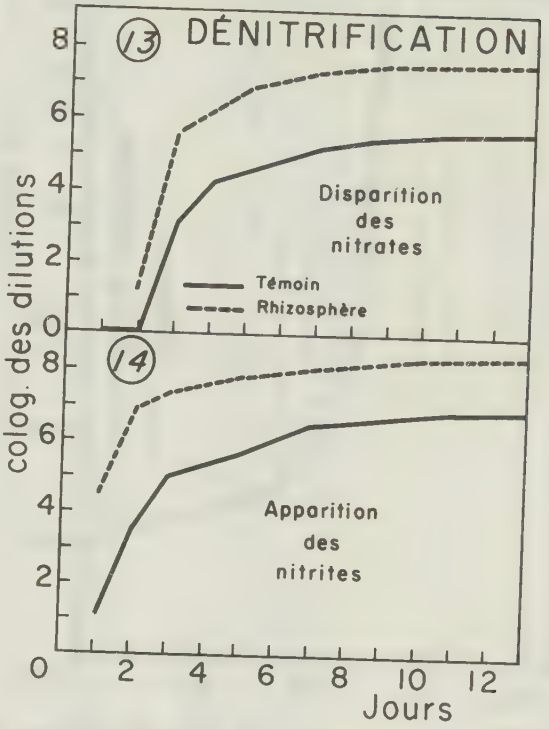
Toutes les mesures sont effectuées selon les techniques qui ont été décrites précédemment.

## C. RESULTATS EXPERIMENTAUX.

Les résultats obtenus au cours de trois semaines de culture sont résumés sur les figures 11 à 15 par les courbes d'activité de l'ammonification, la dénitrification, la protéolyse et l'amylolyse. Le tableau IX donne les valeurs finales pour la microflore totale, les fixateurs d'azote et les nitrificateurs.

INFLUENCE DE L'EFFET RHIZOSPHERE DU LIN EN CONDITIONS HYDROPONIQUES, A L'EGARD DE DIVERS GROUPES FONCTIONNELS



INFLUENCE DE L'EFFET RHIZOSPHERE DU LIN EN CONDITIONS HYDROPONIQUES, A L'EGARD DE L'AMYLOLYSE

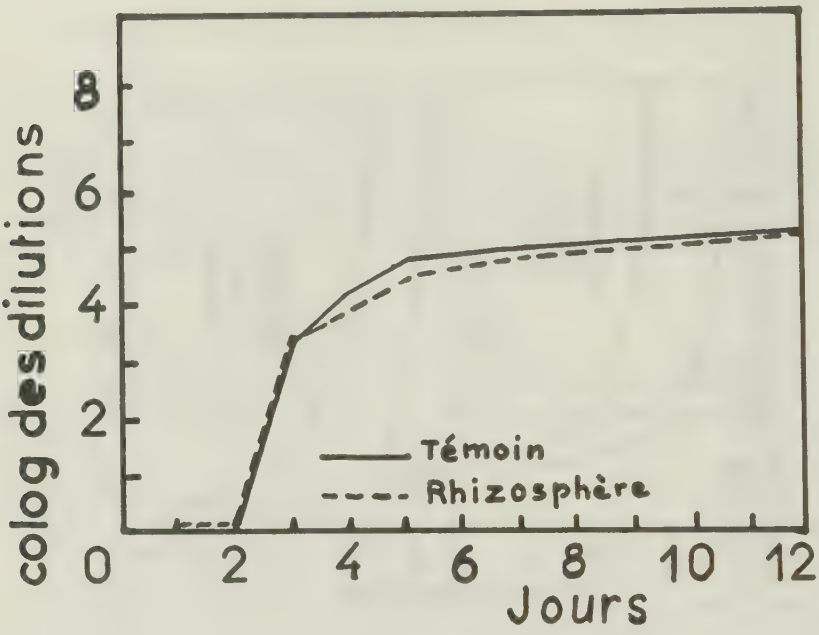



Tableau IX

INFLUENCE DE "L'EFFET RHIZOSPHERE DU LIN EN CONDITIONS HYDROPONIQUES SUR LA MICROFLORE TOTALE ET CERTAINS GROUPES FONCTIONNELS
(nombre de germes dans 1 millilitre de milieu liquide)

| | Rhizosphère | Témoin | R/S |
|---|---|---|---|
| Microflore totale | $130 \times 10^6$ | $20 \times 10^6$ | 6,5 |
| Microflore fixatrice aérobie (Azotobacter) | $1,7 \times 10^2$ | $1,3 \times 10^2$ | 1,3 |
| Microflore nitrifiante (germes nitreux) | $2 \times 10^1$ | $1,3 \times 10^1$ | 1,4 |
| Microflore nitrifiante (germes nitriques) | 0 | 0 | 0 |

- Interprétation et discussion.

L'ensemble des résultats obtenus montre, que la microflore tellurique en culture hydroponique réagit aux sécrétions radicellaires du Lin, pratiquement seule source carbonée mise à sa disposition.

Les conditions de vie aquatique semblent ne pas gêner les relations entre la microflore et les exsudats. Nous constatons ici les effets que nous avions signalés en conditions naturelles, c'est-à-dire : stimulation de la microflore totale et des groupes fonctionnels, à l'exception des germes amylolytiques qui ne réagissent pas.

La stimulation des fixateurs d'azote et des nitrificateurs, très peu nombreux dans la terre, n'est pas significative.

D'autre part, si nous comparons les différences des cologarithmes des dilutions-limites des principaux groupes fonctionnels entre la rhizosphère et le témoin en conditions naturelles (champs et serre, tableaux 1 à 8) un mois après germination (effet rhizosphère maximum), aux mêmes différences en conditions hydroponiques, nous obtenons les résultats suivants :

Tableau X

RESULTATS COMPARES OBTENUS EN TERRE ET EN CULTURE HYDROPONIQUE VIS-A-VIS DE QUELQUES GROUPES FONCTIONNELS

| Groupes physiologiques | | Rhizosphère Colog. dil. lim. | Témoin Colog. dil. lim. | Différence des Colog. |
|---|---|---|---|---|
| Ammonification | C | 7,9 | 6,7 | 1,2 |
| | S | 8,0 | 6,8 | 1,2 |
| | H | 8,2 | 6,8 | 1,4 |
| Protéolyse | C | 8,2 | 7,0 | 1,2 |
| | S | 8,2 | 7,1 | 1,1 |
| | H | 8 | 6,3 | 1,7 |
| Dénitrification (disparition des nitrates) | C | 7,2 | 5,8 | 1,4 |
| | S | 7,2 | 6,2 | 1,0 |
| | H | 7,5 | 5,6 | 1,9 |
| Dénitrification (apparition des nitrites) | C | 8,4 | 8,5 | 0,9 |
| | S | 8,4 | 7,4 | 1,0 |
| | H | 8,5 | 6,8 | 1,7 |

C : Culture en conditions naturelles en champs
S : Culture en conditions naturelles en serre
H : Culture en conditions hydroponiques

On peut donc penser que les excrétions radicellaires jouent le rôle capital dans l'effet rhizosphère, la structure physico-chimique du sol serait un facteur secondaire, puisque même dans un milieu liquide les microorganismes réagissent de même manière aux excrétions.

Chapitre V

# ASPECTS MORPHO-PHYSIOLOGIQUES DE LA MICROFLORE DE LA RHIZOSPHERE

## 1. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

### A. CARACTERISATION DES BACTERIES DE LA RHIZOSPHERE.

Les critères de caractérisation des bactéries reposent en général sur trois bases : morphologie et coloration, caractères physiologiques et biochimiques et le pouvoir de synthèse.

a) Morphologie et coloration.

Sans exception, tous les travaux s'accordent sur le fait que les bactéries Gram-négatif, non sporulées prédominent dans la rhizosphère, tandis que les bacilles Gram-positif, les cocci et formes coccoïdes y sont relativement moins abondants (KRASSILNIKOV et Coll., 1936 ; STARKEY, 1938 ; LOCHHEAD, 1940 ; CLARK, 1948 ; WEBLEY, EASTWOOD et GIMINGHAM, 1952 ; CONTOIS, 1953 ; KING et WALLACE, 1956 ; ROVIRA, 1956 ; SPERBER et ROVIRA, 1959 ; RIVIERE, 1962). Par exemple, CLARK (1940) a montré que sur 400 souches isolées de racines de coton, 67 % sont des bâtonnets Gram-négatif, alors que 20 % seulement sont rencontrés dans le sol ; 12 % sont des cocci Gram-positif contre 40 % dans le sol. Les formes sporulées sont encore plus inhibées : 1 % se retrouve sur les racines, dans le sol, elles représentent 30 % de la population.

LOCHHEAD (1940) arrive aux mêmes conclusions mais signale également l'importance de types pléomorphes tel que B. globiformis, le principal caractère étant la tendance fréquente vers les formes ramifiées. Ces dernières prises dans leur ensemble, prédominantes dans le sol, seraient moins abondantes dans la rhizosphère. Néanmoins, si l'on considère seulement les formes ramifiées mobiles, celles-ci y seraient préférentiellement stimulées. SPERBER et ROVIRA (1959), ROVIRA et STERN (1961) montrent également que les formes filamenteuses prédominent, mais l'apparition de ces types, selon ces auteurs, est liée en partie au milieu de culture utilisé pour leur isolement (SPERBER et ROVIRA, 1959).

Si les études comparatives de la répartition de types morphologiques diffèrents entre sol et rhizosphère ne laissent pas de doute, l'effet rhizosphère entre espèces végétales semble ne pas apporter de différences notables : KRASSILNIKOV (1936), STARKEY (1938), KING et WALLACE (1956). Cependant, pour LOCHHEAD (1940), les formes courtes, Gram-négatif sont relativement plus nombreuses dans la rhizosphère de variétés de Lin sensibles à la flétrissure et de Tabac sensible à la pourriture noire des racines, que les formes coccoïdes et sporulées. L'auteur en conclut que "l'effet rhizosphère" est plus prononcé chez les variétés sensibles.

b) Caractères physiologiques et biochimiques.

Le fait que les bactéries soient plus nombreuses dans la rhizosphère que dans le sol témoin témoigne d'une activité physiologique plus intense. LOCHHEAD (1940) observe que les bactéries isolées de la rhizosphère sont des formes, contrairement à celles du sol, se développant intensément sur gélose nitritive. Ces formes seraient, pour beaucoup, mobiles, et appartiendraient à des types chromogènes donnant une réaction alcaline ou acide en présence de glucose.

c) Les types nutritionnels bactériens : pouvoir de synthèse.

En 1940, WEST et LOCHHEAD suggèrent un nouveau critère de caractérisation et de classification des bactéries du sol, basé sur l'aptitude à synthétiser certains composés définis et indispensables à leur croissance, aptitude d'ordre qualitatif et non quantitatif. Cette nouvelle méthode consiste à observer la croissance de bactéries, primitivement isolées d'un milieu solide non sélectif, sur des milieux variant dans leur complexité quant à la source azotée. Sept milieux différents permettent de répartir les bactéries en sept groupes.

Groupe I : Bactéries proliférant dans un milieu minéral avec glucose et $NO_3K$ comme seule source azotée.
Groupe II : Bactéries nécessitant pour leur croissance un ou plusieurs acides aminés additionnés au milieu de base.
Groupe III : Bactéries demandant des facteurs de croissance ajoutés au milieu de base (thiamine, biotine, pyridoxine, a. panthoténique, a. nicotinique, riboflavine, inositol).
Groupe IV : Bactéries nécessitant à la fois acides aminés et facteurs de croissance ajoutés au milieu de base.
Groupe V : Bactéries demandant des substances non identifiées, contenues dans l'extrait de levure Difco, ajoutées au milieu de base.
Groupe VI : Bactéries demandant des substances inconnues, contenues dans l'extrait de sol (Terregens facton), ajoutées au milieu de base.
Groupe VII : Bactéries exigeant dans le milieu de base les substances non identifiées de l'extrait de levure et de l'extrait de terre.

1°) Répartition des types nutritionnels bactériens dans la rhizosphère.

HILDEBRAND et WEST (1941), mettant à profit cette méthode, ont

pu montrer que "l'effet rhizosphère" du Fraisier exerce une stimulation des germes ayant besoin d'acides aminés pour leur croissance.

LOCHHEAD et THEXTON (1947), dans une étude sur la Betterave, montrent que la répartition des bactéries de la rhizosphère se fait essentiellement sur les trois premiers groupes. Le groupe II serait préférentiellement stimulé par rapport au groupe I, tandis que le groupe III régresserait. Les autres groupes y sont relativement moins nombreux. Faits confirmés par LOCHHEAD (1948), KATZNELSON et coll. (1956), STRZELCZYK (1961), mais infirmés par IVARSON et KATZNELSON (1960), RUSCHEL et DOBEREINER (1961), RIVIERE (1961).

LOCHHEAD et BURTON (1957), LOCHHEAD (1957) ont pu montré que si les bactéries ayant besoin de facteurs de croissance sont proportionnellement moins nombreuses dans la rhizosphère, par contre le pourcentage des bactéries capables de synthétiser dans des milieux variés, un ou plusieurs facteurs de croissance déterminés : thiamine, biotine, vitamine $B_{12}$, riboflavine et le facteur "Terregens" est dans l'ensemble plus élevé. Cependant, il existe des différences dans l'élaboration de ces vitamines. Ainsi la riboflavine, la thiamine et la biotine sont synthétisées par un plus grand nombre d'organismes de la rhizosphère de l'Orge. Ces résultats suggèrent que ces bactéries peuvent aussi avoir une signification dans les interrelations de la microflore et de la plante.

2°) Effets rhizosphère spécifiques sur la répartition des types nutritionnels.

Il y a trop peu de travaux pour tirer une conclusion définitive. WALLACE et LOCHHEAD (1949), RUSCHEL et DOBEREINER (1961), ROUATT et KATZNELSON (1961) trouvent des différences significatives dans la rhizosphère de plusieurs plantes. Ainsi, ROUATT et KATZNELSON (1961) étudiant six plantes : Trèfle, Lin, Avoine, Maïs, Orge et Blé, mentionnent un effet spécifique, plus prononcé dans le rhizoplan que dans la rhizosphère, vis-à-vis de certains groupes physiologiques et du groupe nutritionnel bactérien exigeant des amino-acides. Par ordre de stimulation, les espèces se classent de la façon suivante :

Rhizoplan : Lin, Avoine, Orge, Blé, Trèfle, Maïs.
Rhizosphère : Lin, Orge, Blé, Avoine, Maïs, Trèfle.

Il est surprenant de voir que le Trèfle soit le moins stimulé des végétaux. Ceci est en contradiction avec les travaux antérieurs qui insistent sur une stimulation préférentielle par les Légumineuses (WALLACE et LOCHHEAD, 1949).

Etudiant la population de la microflore des graines, WALLACE et LOCHHEAD (1951) ont pu également démontrer que celle-ci pouvait avoir une spécificité. La majorité des bactéries du Blé appartient aux groupes nutritionnels I, II et IV, celles de l'Avoine au groupe II, celles du Trèfle et de la Fléole principalement au groupe V, celles de la Luzerne aux groupes IV et V, celles du Lin aux groupes II et V. Les groupes VI et VII ne sont pratiquement pas représentés à la surface d'aucune graine.

MACURA (1958), cherchant à élucider le rôle de la microflore de la graine et de la microflore tellurique dans l'effet rhizosphère en conditions hydroponiques, arrive aux conclusions suivantes :

- Lorsque la microflore de la graine est la seule source de microorganismes, l'effet rhizosphère (Blé) se traduit par une augmentation des bactéries nécessitant des acides aminés.

- Lorsque la microflore de la graine et la microflore du sol sont en présence, l'effet rhizosphère est marqué par une stimulation des organismes ayant des besoins nutritionnels simples (prolifération sur un milieu additionné d'Azote minéral).

Les résultats obtenus par TARDIEUX et coll. (1961), sur le Maïs, sont assez différents : le pourcentage des germes capables d'utiliser l'Azote minéral est dominant sur la graine, tandis que ce sont les germes nécessitant des acides aminés et des facteurs de croissance qui sont en majorité dans la rhizosphère provoquée par l'ensemble des deux microflores.

Il semble bien ici que l'espèce végétale soit en cause.

## B. CLASSIFICATION DES ESPECES ET GENRES PREDOMINANTS DANS LA RHIZOSPHERE.

Malgré la quantité considérable d'études sur les caractères de la microflore de la rhizosphère, il en existe peu sur la classification dans leurs genres respectifs de toutes les souches isolées. Ceci tient sans doute à ce que les clés de détermination des bactéries, sont souvent inapplicables aux germes telluriques. CHESTER (1900) en donne l'explication suivante : "Les bactéries du sol sont des agents actifs dans la digestion et l'élaboration d'un matériel organique bien différent de celui composant les substrats synthétiques utilisés en pathologie animale". Il lance alors la nécessité d'un système de classification se rapprochant plus étroitement des conditions telluriques et des fonctions qui s'y rattachent. Il insiste particulièrement sur la nature du substrat pour l'isolement des germes telluriques et, en 1903, il publie la première étude de type prédominants dans le sol à partir d'une dilution de sol à 1 p. cent mille ensemencée sur plaque de gélatine.

Ce principe d'isolement devait servir de point de départ à toutes les études qualitatives en microbiologie du sol. L'extrait de terre gélosé est maintenant presque toujours substitué à la gélatine.

Il y a beaucoup de divergences entre les auteurs et de plus, plusieurs bactéries appartenant au même genre portent des noms différents suivant la clé de détermination utilisée par eux.

Les bactéries les plus fréquemment signalées dans la littérature peuvent être divisées en deux groupes :

- Les bâtonnets Gram-négatif pigmentés ou non, appartenant aux genres Pseudomonas, Flavobacterium, Chromobacter, Xanthomonas, Achromo-

bacter et les bâtonnets Gram-positif sporulés : Bacillus.

- Les formes ramifiées dont l'importance dans le sol a été signalée par JENSEN (1933), KRASSILNIKOV (1934), TOPPING (1937), etc. On y rencontre les genres Corynebacterium, Mycobacterium, Mycoplana, Arthrobacter Nocardia.

Pour certains auteurs tels que WEBLEY et Coll. (1952), VAGNEROVA et Coll. (1960), SPERBER et ROVIRA (1959), ce sont les bactéries ramifiées qui se rencontrent le plus souvent à la surface des racines. Par exemple, SPERBER et ROVIRA (1959) trouvent que 63 % des bactéries du Trèfle et 78 % de celles du ray-grass peuvent être identifiées comme Arthrobacter ou Nocardia, alors que ROUATT et KATZNELSON (1961) au contraire soulignent une régression des Arthrobacter et en général de toutes les formes ramifiées.

En dehors des formes ramifiées, les membres du genre Bacterium et Pseudomonas constituent les principaux représentants de la microflore des racines (KRASSILNIKOV, 1934). Mais c'est surtout la famille des Pseudomonaceae qui semble de loin dominer (CLARK, 1940 ; GYLLENBERG, 1955 ; BEREZOVA, 1956 ; VAGNEROVA et coll. , 1960 ; RIVIERE, 1961), alors que les Bacillus prédominent dans le sol témoin (RIVIERE, 1961).

Avec les Pseudomonas les types associés aux racines sont différents de ceux rencontrés dans le sol.

La composition de la microflore tellurique pourrait également jouer un rôle important dans celle de la rhizosphère et expliquer en partie certaines divergences. C'est ainsi que les sols tchécoslovaques sont cinq fois plus riches en Bacillus et six fois moins riches en Arthrobacter que les sols canadiens.

Il nous a donc semblé intéressant, de suivre par une méthode adaptée l'évolution de la microflore tellurique soumise à la seule influence des sécrétions radicellaires.

## 2. ETUDE DE L'ACTION DES EXCRETIONS DU LIN SUR LA MICROFLORE TELLURIQUE

Le but de cette recherche est de préciser le rôle et la nature des germes telluriques éventuellement sélectionnés par les sécrétions radicellaires du Lin aux premiers stades de croissance.

La culture hydroponique, malgré ses imperfections nous a paru être une méthode pour éliminer toute "source" alimentaire autre que les excrétions radicellaires. On sait, par exemple, que les substances humiques du sol sont de puissantes réserves énergétiques pour les microorganismes. De plus, il a été possible aussi de dégager l'action des sécrétions radicellaires sur la microflore tellurique d'une part, sur la microflore propre de

la graine, et, enfin sur l'association des deux microflores de la graine et du sol.

## A. TECHNIQUES UTILISEES.

### a) La culture.

La culture est réalisée en tubes, sur milieu de BORNER et RODEMACHER (voir chapitre II). Les graines, quand elles doivent être désinfectées, sont traitées par un bain d'hypochlorite de Ca à 7 %, puis lavées à l'eau distillée.

### b) Isolement des bactéries.

Les isolements bactériens sont réalisés sur extrait de terre gélosé à 15 p. mille, coulé en boîte de Pétri, ensemencé avec 0,1 ml d'une dilution adéquate de liquide de culture, pour obtenir une vingtaine de colonies par boîte après incubation de sept jours à 28°. Chacune d'elles, après purification si besoin, est repiquée sur le milieu de conservation semi-solide de LOCHHEAD (1952) :

| | |
|---|---|
| Extrait de sol | 900 ml |
| Extrait de levure | 100 ml |
| Phosphate bipotassique | 0,2 g |
| Gélose Difco | 3 g |

### c) Caractérisation des souches isolées.

- Etude morphologique.

Une culture jeune sur le milieu ci-dessus, non gélosé, renseigne sur le signe du Gram, la morphologie, la mobilité du germe. Par un test de thermorésistance sur une culture plus âgée (48 heures à 5 jours, selon le germe) en vérifie la présence ou l'absence de spores.

Le pouvoir pigmentaire est observé sur gélose nutritive glycérinée inclinée et sur milieu à la pomme de terre.

La morphologie des colonies est donnée par une culture sur le milieu de LOCHHEAD gélosé à 12 p. mille.

- Etude physiologique.

On apprécie la capacité de culture du germe sur les milieux usuels de laboratoire : bouillon nutritif, eau peptonée ou un milieu extrait de sol-extrait de levure.

Le degré d'aérobiose est évalué sur gélose profonde V. F. (viande foie), ou gélose profonde à l'extrait de sol-extrait de levure, selon l'aptitude de développement du germe sur l'un des milieux.

La formation d'ammoniac est détectée sur le milieu à l'asparagine, la réduction des nitrates sur le milieu nitrate-glucose, la recherche du pouvoir gélatinolytique sur le milieu gélatine-nitrate, du pouvoir amylolytique sur le milieu à l'amidon (chapitre I). De nombreux germes telluriques ne se développant pas en eau peptonée, l'acidification du glucose et du lactose est suivie dans le milieu préconisé par KAISER (1961) :

| | |
|---|---|
| Solution saline de WINOGRADSKY | 50 ml |
| Extrait de terre | 50 ml |
| Nitrate d'ammonium | 3 g |
| Eau distillée | 900 ml |

On répartit en tubes de 17 mm de diamètre, à raison de 5 ml. Stérilisation à 110° pendant 20 minutes.

La solution de sucre est ajoutée stérilement à la concentration de 1 p. cent.

L'utilisation des citrates est mise en évidence, sur le milieu de KOSER-SIMON, par un virage au bleu foncé.

L'ensemencement du lait se fait à partir d'une culture solide sur gélose extrait de sol-extrait de levure.

d) Classification des souches isolées.

La caractérisation des germes telluriques est toujours laborieuse en raison de leurs réactions fréquemment négatives envers les milieux et les tests biochimiques classiques et, par suite, de l'absence de clé de détermination utilisable.

Nous avons pu démontrer entre autre (CHALVIGNAC, 1960), que le bouillon nutritif (à la peptone de viande) ne peut systématiquement être utilisé comme milieu de base (alors qu'il est d'usage général pour les identifications classiques) puisque 10 p. cent au moins des bactéries du sol sont incapables d'y proliférer. Des études de croissance de ces souches nous ont permis de constater qu'il existe bien un principe actif spécifique dans l'extrait de sol (manquant évidemment dans ce bouillon), éventuellement "Terregens factor" signalé par LOCHHEAD et BURTON (1953), mais également, que, sur certaines souches (3 souches sur 12), le bouillon nutritif avait un pouvoir inhibiteur, celui-ci pouvant être levé par dilution du bouillon. La concentration inhibitrice a pu être précisée : dès que la proportion de bouillon atteint 50 p. 100, le pouvoir inhibiteur se manifeste et est total aux concentrations supérieures.

Les tests de différenciations classiques tels que : formation d'indole, production d'acétyméthylcarbinol, production d'$H_2S$, utilisation du citrate, réaction du lait sont très rarement positifs. On conçoit alors, dans l'état de la systématique actuelle, les difficultés de classification de ces bactéries, tout au moins pour la détermination de l'espèce. Dans une récente publication, BRISBANE et ROVIRA (1961) ont montré que 318 souches telluriques formaient un gradient continu vis-à-vis de 16 caractères, rendant

ainsi le système de division des caractères sans valeur, à cause du manque de groupes distincts parmi les bactéries considérées.

Nous avons cependant tenté une classification de nos germes. Précisons que ces résultats ne peuvent avoir que valeur de proposition et qu'en toute rigueur bien des espèces que nous avons isolées du sol devraient être décrites comme "espèces nouvelles".

e) Etude du pouvoir de synthèse des bactéries.

Pour juger du pouvoir de synthèse des bactéries, c'est-à-dire rechercher la limite qualitative de leur exigence vis-à-vis de la source azotée, trois milieux parmi les sept préconisés par WEST et LOCHHEAD (1940) ont été retenus.

Nous appelerons bactéries à fort pouvoir de synthèse, celles capables de se développer sur un milieu en présence d'azote minéral et, bactéries à faible pouvoir de synthèse, celles exigeant pour la prolifération, une source azotée d'origine organique.

Milieu B : Milieu strictement minéral ; seules les bactéries à pouvoir de synthèse élevé s'y développent.

| | | |
|---|---|---|
| Phosphate bipotassique | 1 | g |
| Nitrate de potassium | 1 | g |
| Sulfate de magnésium | 0,2 | g |
| Chlorure de calcium | 0,1 | g |
| Chlorure de sodium | 0,1 | g |
| Perchlorure de fer à 28 % | 0,1 | ml |
| Glucose | 1 | g |
| Solution d'oligo-éléments | 1 | ml |
| Eau distillée Q. S. | 1000 | ml |

Pour les germes à pouvoir de synthèse faible, deux milieux ont été retenus.

Milieu A : Identique au milieu B, mais additionné de 0,4 % d'hydrolysat de caséine exempt de vitamines (casamino-acid vitamine free Difco), pour les germes exigeant des acides aminés.

Milieu YS : Identique au milieu B, avec adjonction de 0,1 % d'extrait de levure (yeast extrait Difco) pour permettre la prolifération des germes nécessitant vitamines et facteurs de croissance pour leur croissance.

Chacun des milieux est réparti à raison de 5 ml par tube de 17 mm de diamètre et stérilisé 20 minutes à 112°.

Pour chaque souche, deux passages au moins sont nécessaires avec des ensemencements pratiqués avec un fil de platine.

f) Mesure du taux de croissance.

Le germe à étudier est cultivé sur milieu extrait de terre, en conditions agitées, à 28°, dans la cellule du biophotomètre enregistreur de BONNET et MAURY ; le taux de croissance est calculé d'après la courbe de croissance enregistrée.

## B. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

Comme nous l'avons mentionné, nous avons étudié l'action de la culture de plantules de Lin à ses premiers stades de croissance, sur :

- La microflore de la graine :
  Dans ce but, des graines non désinfectées sont mises à germer en milieu de BORNER stérile.

- La microflore tellurique :
  Des graines désinfectées sont mises à germer dans le milieu de BORNER ensemencé simultanément avec 1 ml de suspension-dilution de terre au 1/1000.

- La microflore de la graine en association avec la microflore tellurique :
  Des graines non désinfectées sont mises à germer dans le milieu de BORNER ensemencé comme ci-dessus.

- Le témoin :
  Sans culture de Lin, est constitué par du milieu de BORNER ensemencé par la même dilution-suspension de terre.

Cinq tubes de culture par lot sont préparés et portés à la serre pendant trois semaines. A ce stade de croissance, les plantules de Lin atteignent une hauteur de 15 à 20 cm. Après avoir soigneusement retiré les plantules et leurs racines, les liquides de culture des cinq tubes des lots respectifs sont mélangés, agités 10 minutes à l'agitateur mécanique, et le prélèvement pour les isolements bactériens, effectué. Quarante colonies par lot ont été ainsi isolées.

## C. RESULTATS EXPERIMENTAUX.

a) Répartition morphologique.

Sur deux récoltes différentes (1960 et 1961), nous avons suivi la répartition des souches bactériennes isolées des 4 lots cités en fonction de : leur forme, leur réaction à la coloration de Gram et leur mobilité, à raison de 40 à 50 souches par lot et par récolte.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Nous retrouvons ici les résultats les plus habituellement obtenus dans les études sur la rhizosphère, c'est-à-dire diminution des coccis et augmentation des formes bacillaires.

b) Caractérisation et classification des souches bactériennes.

Cette classification repose sur les souches isolées de la récolte de 1961. 40 souches provenant de chacun des quatre lots suivants ont été testées et classées.

Lot A : lot témoin (bactéries du sol seules)
Lot B : lot avec lin en présence des bactéries du sol
Lot C : lot avec lin en présence des bactéries de la graine
Lot D : lot avec lin en présence des bactéries en association : bactéries du sol et bactéries de la graine.

Les bactéries isolées sur extrait de terre gélosé ont été repiquées dans le milieu semi-solide à l'extrait de terre extrait de levure de LOCHHEAD. Après vérification de la pureté, nous avons tenté, à l'aide de la clé de détermination de PREVOT (1961), de reporter les souches dans les familles auxquelles elles semblent le mieux s'apparenter. Les principaux critères de cette systématique sont la réaction Gram, la mobilité et la pigmentation. C'est ce dernier caractère apparaissant très souvent chez les bactéries réagissant à "l'effet rhizosphère" qui nous l'a fait adopter et préférer à d'autres systèmes de classification. Cependant, nous avons dû avoir souvent recours pour compléter les caractères de certaines souches, au Manuel de BERGEY et à la clé de SKERMANN (1959).

Le système de classification en ordres, familles et genres reste celui de PREVOT (1961). Seuls, les Arthrobacter non mentionnés dans cette systématique appartiennent à la classification de BERGEY.

La position de chacune des souches dans cette systématique a été recherchée à l'aide des caractères morphologiques, culturaux et biochimiques suivants :

- Examens microscopiques de la morphologie et de la mobilité à partir d'une culture de 16 à 24 heures.

- Réaction de Gram.

- Aspect des colonies sur gélose nutritive ou gélose à l'extrait de terre.

- Réaction du lait.

- Aspect de culture sur pomme de terre.

- Liquéfaction de la gélatine.

- Réaction du milieu au citrate utilisé comme seule source de carbone.

- Réduction des nitrates.

- Caractères fermentaires.

- Pouvoir trophique.

- Degré d'aérobiose.

Après étude de ces critères, la répartition des souches dans différents lots s'établit ainsi :

CLASSE DES ASPORULALES

(A) Ordre des Micrococcales

Famille des Micrococcaceae

Dans cette famille, nous avons pu classer les 8 souches appartenant à l'ordre des Micrococcales. Toutes sont issues de la tribu : Micrococceae (PREVOT, 1933) du genre Micrococcus (COHN, 1872) se répartissant parmi les espèces suivantes :

Trois souches du lot A et une souche du lot B se classent parmi l'espèce Micrococcus conglomeratus (MIGULA, 1900). Une souche du lot A présente tous les caractères de l'espèce Micrococcus freudenreichi (GUILLEBEAU, 1891) mais son incapacité de prolifération sur pomme de terre en fait une variété nouvelle. Une autre souche s'apparente à celle-ci mais ne se développe pas sur bouillon.

Les caractères de non liquéfaction de la gélatine, l'absence de culture sur pomme de terre font de deux souches du lot A une variété nouvelle parmi l'espèce Micrococcus flavus (TREVISAN, 1889).

(B) Ordre des Bactériales

Famille des Pseudomonadaceae

Dans cette famille, nous avons pu classer :

18 souches appartenant au lot A
29 souches appartenant au lot B
39 souches appartenant au lot C
30 souches appartenant au lot D

se répartissant dans les diverses tribus de cette famille.

Tribu des Pseudomonadaea
Genre des Pseudomonas

Dans ce genre, nous avons pu inclure :

1 souche appartenant au lot A
5 souches appartenant au lot B
8 souches appartenant au lot C
6 souches appartenant au lot D

ui se classent parmi les espèces suivantes :

Une souche du lot A, trois souches du lot B, une souche du lot C, cinq ouches du lot D appartiennent à l'espèce Pseudomonas fluorescens MIGULA, 1895).

Deux souches du lot B, sept souches du lot C et une souche du lot D ppartiennent à l'espèce Pseudomonas ovalis (CHESTER, 1901).

Tribu des Achromobactereae
(a) genre Achromobacter

Dans ce genre, nous avons inclus :

4 souches du lot A
5 souches du lot B
1 souche du lot C
3 souches du lot D

ui se classent parmi les espèces suivantes :

Deux souches du lot A, une souche du lot D se rattachent à l'espèce chromobacter liquefaciens (FRANKLAND, 1894). Deux souches du lot A, uatre souches du lot B, une souche des lots C et D appartiennent à l'es-èce Achromobacter rathanis (GRAY et THORNTON, 1928).

Une souche des lots B et D ne réduit pas les nitrates en nitrites, ais peut cependant être rangée dans cette espèce, ce caractère étant si-nalé comme variable.

(b) genre Acinetobacter

Dans ce genre, nous avons pu inclure :

9 souches du lot A
5 souches du lot B
3 souches du lot C
4 souches du lot D

ui se répartissent parmi les espèces suivantes :

Deux souches du lot A, une souche du lot B appartiennent à l'espèce cinetobacter candicans (G. et P. FRANKLAND, 1889). Trois souches du t C, deux souches du lot D possèdent les caractères d'Acinetobacter can-cans mais ne se développent pas sur bouillon.

Deux souches du lot B, une souche du lot A, appartiennent à l'espèce cinetobacter viscolactis (MEZ, 1898). Deux souches du lot A et deux sou-es du lot D se rattachent à l'espèce Acinetobacter Winogradski (LEMOI-E, GIRARD et JACOBELLI, 1952).

Quatre souches du lot A appartiennent à l'espèce Acinetobacter stationis OBELL et UPHAM, 1944).

Il faut noter ici que parmi ces souches, huit d'entre elles ne se développent pas sur bouillon.

Tribu des Chromobacteriaceae

Cette tribu nous a fourni le plus grand nombre de souches stimulées par "l'effet rhizosphère".

(a) genre Flavobacterium

Dans ce genre, nous avons pu inclure :

1 souche appartenant au lot A
5 souches appartenant au lot B
6 souches appartenant au lot C
7 souches appartenant au lot D

qui se classent parmi les espèces suivantes :

Deux souches du lot D appartiennent à l'espèce Flavobacterium candatum (WRIGHT, 1914).

Une souche du lot D appartient à l'espèce Flavobacterium aurescens (FRANKLAND et FRANKLAND, 1888).

Le reste des souches se classe parmi l'espèce Flavobacterium aurantiacum (ANGST, 1929). Cependant, nous n'avons pas mis en évidence le caractère complémentaire signalé par BRISOU (1956), la production d'$H_2S$.

(b) genre Empedobacter

Dans ce genre, nous avons pu inclure :

3 souches appartenant au lot A
7 souches appartenant au lot B
20 souches appartenant au lot C
8 souches appartenant au lot D

se classent parmi les espèces suivantes :

Trois souches du lot A, deux souches du lot B, une souche du lot C se rattachent à l'espèce Empedobacter fucatum (HARRISON, 1929).

Deux souches du lot B, cinq souches du lot D se rattachent à l'espèce Empadobacter dormitator (WRIGHT, 1895).

Trois souches du lot B se rattachent à l'espèce Empedobacter solore (LEHMANN et NEUMANN, 1896).

Trois souches du lot D pourraient se classer dans l'espèce Empedobacter peregrinum (STAPP et SPICHER, 1959), mais les caractères fermentaires les en éloignent, nous en ferons donc une espèce Empedobacter peregrinum variété nouvelle.

Nous avons réservé une place particulière à la majorité des Empedobacter isolés de la graine.

Ces germes immobiles très polymorphes, leur longueur allant des formes filamenteuses de 8 à 10 jusqu'aux formes de 0,7 à 1 de long mais, le plus souvent, ils se présentent en bâtonnets de 2 à 4 de long sur 0,4 de large, Gram négatif, les cellules colorées montrent fréquemment un centre plus clair. Ne prolifèrent ni sur bouillon, ni sur gélose. N'utilisent pas le citrate comme source de Carbone. Sur pomme de terre, ils produisent une culture maigre légèrement rosée. Ils sont microaérophiles, liquéfient la gélatine, réduisent les nitrates en nitrites, hydrolysent activement l'amidon, sont glucidolytiques. Enfin, l'extrait de sol est indispensable à leur prolifération.

Le caractère d'immobilité nous empêche selon la systématique de PREVOT de reporter ce germe dans le genre Serratia, germe de petite taille essentiellement mobile, pigmenté en rouge. Nous le laisserons donc dans le genre Empedobacter espèce nouvelle Empedobacter Lini.

(c) genre Serratia

Dans ce genre, nous avons pu inclure :

2 souches appartenant au lot B
1 souche appartenant au lot C
2 souches appartenant au lot D

Toutes les souches appartiennent à l'espèce Serratia ruber (den DOOREN de JONG, 1926).

CLASSE DES SPORULALES (Eubacteriales sporulées)

Ordre des Bacillales
Famille des Bacillaceae

Dans cette famille, nous avons pu inclure :

3 souches appartenant au lot A
4 souches appartenant au lot B
1 souche appartenant au lot C
4 souches appartenant au lot D

se classant dans le genre Bacillus parmi les espèces suivantes :

Une souche du lot A et trois souches du lot B appartiennent à l'espèce Bacillus subtilis (COHN, 1872). Le reste des souches appartient à l'espèce Bacillus megatherium (BARY, 1884).

## CLASSE DES ACTINOMYCETALES

### Ordre des Actinobacteriales
### Famille des Actinomycetaceae

Dans cette famille, nous avons inclus :

12 souches appartenant au lot A
7 souches appartenant au lot B
1 souche appartenant au lot C
7 souches appartenant au lot D

La détermination du genre de ces souches n'est pas aisée. Si nous examinons la systématique française, nous avons le choix entre les genres Nocardia et Corynebacterium. PREVOT réserve le genre Corynebacterium aux espèces, pour la plupart pathogènes, isolées de l'homme et des animaux. Il reste donc pour classer nos souches, le genre Nocardia.

A leur aspect morphologique, à leur cycle évolutif, les germes isolés ne peuvent tous entrer dans ce genre. Nous avons élargi la répartition en y ajoutant le genre Arthrobacter. Nous empruntons à SKERMAN (1959) les caractères différentiels entre ces deux genres très près l'un de l'autre : chez le genre Nocardia, il y a formation d'un mycelium ramifié bien défini dès les premiers stades de croissance. La désintégration de ce mycelium peut donner des corps coccoïdes similaires en apparence à la morphologie des Arthrobacter en culture âgée. Les cellules d'Arthrobacter présentent des aspects anguleux mais jamais de ramification.

### Genre Nocardia

Dans ce genre, nous avons inclus :

5 souches appartenant au lot A
4 souches appartenant au lot B
3 souches appartenant au lot D

se classent parmi les espèces suivantes : deux souches du lot A, trois souches du lot B, deux souches du lot D se rattachent à l'espèce Nocardia alba (KRASSILNIKOV, 1938). Le reste des souches appartient à l'espèce Nocardia flora (KRASSILNIKOV, 1938).

### Genre Arthrobacter

Dans ce genre, nous avons classé :

7 souches appartenant au lot A
3 souches appartenant au lot B
1 souche appartenant au lot C
4 souches appartenant au lot D

se classent parmi les espèces suivantes : quatre souches du lot A appartiennent à l'espèce Arthrobacter terregens (LOCHHEAD and BURTON,

1953). Les autres souches appartiennent à l'espèce Arthrobacter citreus (SACHS, 1954).

D'après leur identification, les 40 souches isolées de chacun des lots se répartissent dans la systématique de la façon suivante (tableau XII) :

Tableau XII

INFLUENCE DE L'EFFET RHIZOSPHERE
SUR LA REPARTITION SYSTEMATIQUE
des souches bactériennes du sol Témoin et de la rhizosphère

| | Lot Témoin | Lots avec lin | | |
|---|---|---|---|---|
| | A | B | C | D |
| Famille des : Micrococcaceae | | | | |
| Micrococcus | 7 | 1 | 0 | 0 |
| Famille des : Pseudomonadaceae | | | | |
| Pseudomonas | 1 ) | 5 ) | 8 ) | 6 ) |
| Achromobacter | 4 ) | 5 ) | 1 ) | 3 ) |
| Acinetobacter | 9 ) 18 | 5 ) 29 | 3 ) 39 | 4 ) 30 |
| Flavobacterium | 1 ) | 5 ) | 6 ) | 7 ) |
| Empedobacter | 3 ) | 7 ) | 20 ) | 8 ) |
| Serratia | 0 ) | 2 ) | 1 ) | 2 ) |
| Famille des : Bacillaceae | | | | |
| Bacillus | 3 | 4 | 1 | 4 |
| Famille des : Actinomycetaceae | | | | |
| Nocardia | 5 | 4 | 0 | 3 |
| Arthrobacter | 7 | 3 | 1 | 4 |

Bactéries du sol : B
Bactéries de la graine : C
Bactéries en association : D

- Interprétation et discussion :

Notons d'abord, à propos de ces résultats, le caractère un peu particulier du sol qui a servi à notre expérimentation : en effet, les Actinomycetaceae y sont en quantités inférieures aux Pseudomonodaceae alors que très fréquemment (ROUATT et KATZNELSON, 1960), les Arthrobacter forment la population dominante des sols ; il semble donc bien que leur proportion soit en réalité variable d'un sol à l'autre (par exemple, VAGNEROVA ne signale que 7 % d'Arthrobacter dans le sol qu'il a étudié contre 36 % de Bacillus). On ne peut donc donner de règle trop générale sur la répartition relative des grands groupes telluriques et, l'importance numérique des Pseudomonodaceae, telle que nous la trouvons dans notre échantillon avait été également signalée par HOLDING (1960) dans le sien.

Mais le fait dominant qui ressort de notre expérimentation est la stimulation très nette, dans la Rhizosphère de cette famille des Pseudomonadaceae, sa prédominance s'établissant aux dépens des Arthrobacter, Micrococcaceae et des Actinomycetaceae. Ainsi se trouvent confirmés les résultats de CLARK (1940), GYLLENBERG (1955), VAGNEROVA (1960), HOLDING (1960), RIVIERE (1961), ROUATT et KATZNELSON (1961), en ce qui concerne la stimulation des Pseudomonodaceae par les sécrétions radicellaires.

Nous avons de plus, précisé que la répartition des genres au sein de cette famille se trouve modifiée par l'effet rhizosphère : les bactéries pigmentées appartenant aux genres Pseudomonas, Flavobacterium, Empedobacter sont surtout stimulées alors que dans le sol dominent surtout les bactéries apigmentées, Achromobacter et Acinetobacter.

Enfin, la comparaison de l'effet rhizosphère sur la microflore tellurique seule ou en association avec celle de la graine fait apparaître que la répartition des familles et des genres est sensiblement la même. Le caractère majeur de la microflore épiphytique, prédominance d'un Empedobacter particulier, disparaît en présence de la microflore tellurique. Aussi, sans nier complètement le rôle de la microflore de la graine dans l'équilibre de la rhizosphère, nous pensons qu'elle exerce davantage son action par la présence d'espèces qui lui sont communes avec celles du sol que par des espèces très spécialisées qui lui sont propres.

c) Etude du pouvoir de synthèse des bactéries.

La répartition des bactéries en fonction de leur pouvoir de synthèse a été étudiée pendant deux années consécutives sur les trois milieux déjà cités. 100 souches par lot ont été isolées.

Les résultats sont groupés dans le tableau XIII.

Tableau XIII

REPARTITION DES SOUCHES BACTERIENNES
EN FONCTION DE LEUR POUVOIR DE SYNTHESE
(pourcentage de cultures positives)

| | | B | | A | | Y. S. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | % | moy. | % | moy. | % | moy. |
| Témoin | | | | | | | |
| | 1960 | 18,4 ) | | 34,8 ) | | 46,8 ) | |
| | | 20,0 ) | | 36,4 ) | | 43,6 ) | |
| Bact. du | | ) | 21,4 | ) | 30,6 | ) | 47,7 |
| sol seules | 1961 | 24,2 ) | | 30,3 ) | | 45,5 ) | |
| | | 23,2 ) | | 21,0 ) | | 55,2 ) | |
| Effet rhizosphère | | | | | | | |
| | 1960 | 55,0 ) | | 29,6 ) | | 15,8 ) | |
| | | 47,4 ) | | 36,3 ) | | 16,3 ) | |
| Bact. de la | | ) | 48,4 | ) | 28,5 | ) | 20,7 |
| graine | 1961 | 46,3 ) | | 27,0 ) | | 16,7 ) | |
| | | 45,0 ) | | 21,1 ) | | 33,9 ) | |
| | 1960 | 55,2 ) | | 26,0 ) | | 18,8 ) | |
| | | 44,5 ) | | 31,3 ) | | 19,2 ) | |
| Bact. du | | ) | 51,3 | ) | 28,7 | ) | 18,6 |
| sol | 1961 | 51,5 ) | | 28,9 ) | | 19,8 ) | |
| | | 54,1 ) | | 29,1 ) | | 16,8 ) | |
| | 1960 | 47,0 ) | | 33,3 ) | | 19,7 ) | |
| | | 43,7 ) | | 29,4 ) | | 29,7 ) | |
| Bact. en | | ) | 51,2 | ) | 31,1 | ) | 17,9 |
| association | 1961 | 54,1 ) | | 30,8 ) | | 15,1 ) | |
| | | 60,0 ) | | 31,8 ) | | 8,9 ) | |

B : Milieu minéral glucosé
A : Milieu minéral glucosé + sasamino acid vitamin free
Y. S. : Milieu minéral glucosé + casamino acid + extrait levure + extrait terre

- Interprétation et discussion :

L'étude du pouvoir de synthèse des bactéries du sol et de la rhizosphère met en évidence les faits suivants :

1) Ce sont les bactéries du groupe B qui se trouvent préférentiellement sélectionnées dans la rhizosphère (microflores : graine sol associés). Peu représentées dans le sol étudié (20 % de la population), leur proportion passe à une moyenne de 50 % sous l'action des racines, au détriment des

bactéries nécessitant des facteurs de croissance, des vitamines et autres substances contenues dans l'extrait de terre (groupe YS). Le pourcentage de celles exigeant des acides aminés seuls n'a pas varié (groupe A).

Ces résultats ne sont pas toujours en accord avec ceux des divers auteurs. Comme nous l'avons vu dans l'exposé bibliographique, l'influence des sécrétions radicellaires sur la répartition des bactéries en fonction de leur exigence nutritionnelle, est discutable et il n'est pas possible sur l'ensemble des travaux, d'affirmer ou d'infirmer une sélection particulière.

2) Quelle que soit l'origine de la microflore : sol, graine ou des deux associées, il y a toujours prédominance de bactéries à pouvoir de synthèse élevé, dans la rhizosphère.

Il est cependant intéressant de souligner que MACURA (1958) obtient également une stimulation des bactéries capables d'utiliser l'azote minéral lorsque les deux microflores sont en présence ; cependant, selon le même auteur, les réactions de chacune d'elles séparément sont différentes des nôtres : prédominance des bactéries nécessitant des acides aminés sur la graine, des bactéries à exigence nutritionnelle faible dans le sol.

La comparaison des résultats de MACURA et des nôtres permet de penser que la sélection des bactéries en fonction de leurs besoins nutritionnels est fonction de la présence de certaines espèces microbiennes bien définies, elles appartiendraient en particulier à ce groupe capable d'assimiler l'azote minéral et à fortiori les sources organiques azotées mises à leur disposition par les sécrétions radicellaires.

d) Etude du taux de croissance.

On utilise le biophotomètre enregistreur de BONNET et MAURY. Chaque cuve contient 7 ml d'extrait de terre (milieu collectif convenant à la culture de tous les germes). Après stérilisation de 20 minutes à 112°, on ensemence avec 0,1 ml de culture prise dans sa phase exponentielle de chacune des souches isolées. Deux enregistrements sont prévus par souche.

Les résultats obtenus sont groupés dans le Tableau XIV et la figure 16.

Tableau XIV

INFLUENCE DE L'EFFET RHIZOSPHERE SUR LA REPARTITION DES SOUCHES BACTERIENNES D'ORIGINES DIVERSES EN FONCTION DE LEUR TAUX DE CROISSANCE

a) Bactéries du sol témoin :

Micrococcus : 0,13 ; 0,16 ; 0,20 ; 0,25 ; 0,25 ; 0,25 ; 0,25.
Flavobacterium : 0,40.
Empedobacter : 0,20 ; 0,20 ; 0,40.
Acinetobacter : 0,10 ; 0,10 ; 0,10 ; 0,14 ; 0,20 ; 0,20 ; 0,30 ; 0,33 ; 0,5.
Achromobacter : 0,02 ; 0,20 ; 0,20 ; 0,20.
Bacillus : 0,12 ; 0,25 ; 1,0 ;
Nocardia : 0,10 ; 0,10 ; 0,18 ; 0,25 ; 0,32.
Arthrobacter : 0,10 ; 0,12 ; 0,12 ; 0,18 ; 0,25 ; 0,25 ; 0,54.

b) Bactéries du sol en présence d'exsudats radicellaires de Lin :

Micrococcus : 0,25.
Flavobacterium : 0,32 ; 0,40 ; 0,40 ; 0,42 ; 0,90.
Empedobacter : 0,32 ; 0,36 ; 0,36 ; 0,40 ; 0, 58 ; 0,60 ; 0,75.
Pseudomonas : 0,37 ; 0,50 ; 0,54 ; 0,56 ; 1,0.
Acinetobacter : 0,12 ; 0,17 ; 0,30 ; 0,40 ; 0,44.
Achromobacter : 0,17 ; 0,26 ; 0,28 ; 0,37 ; 0,58.
Serratia : 0,25 ; 0,25.
Bacillus : 0,75 ; 1,3 ; 1,3; 1,3.
Nocardia : 0,10 ; 0,24 ; 0,36 ; 0,50.
Arthrobacter : 0,16 ; 0,36 ; 0,50.

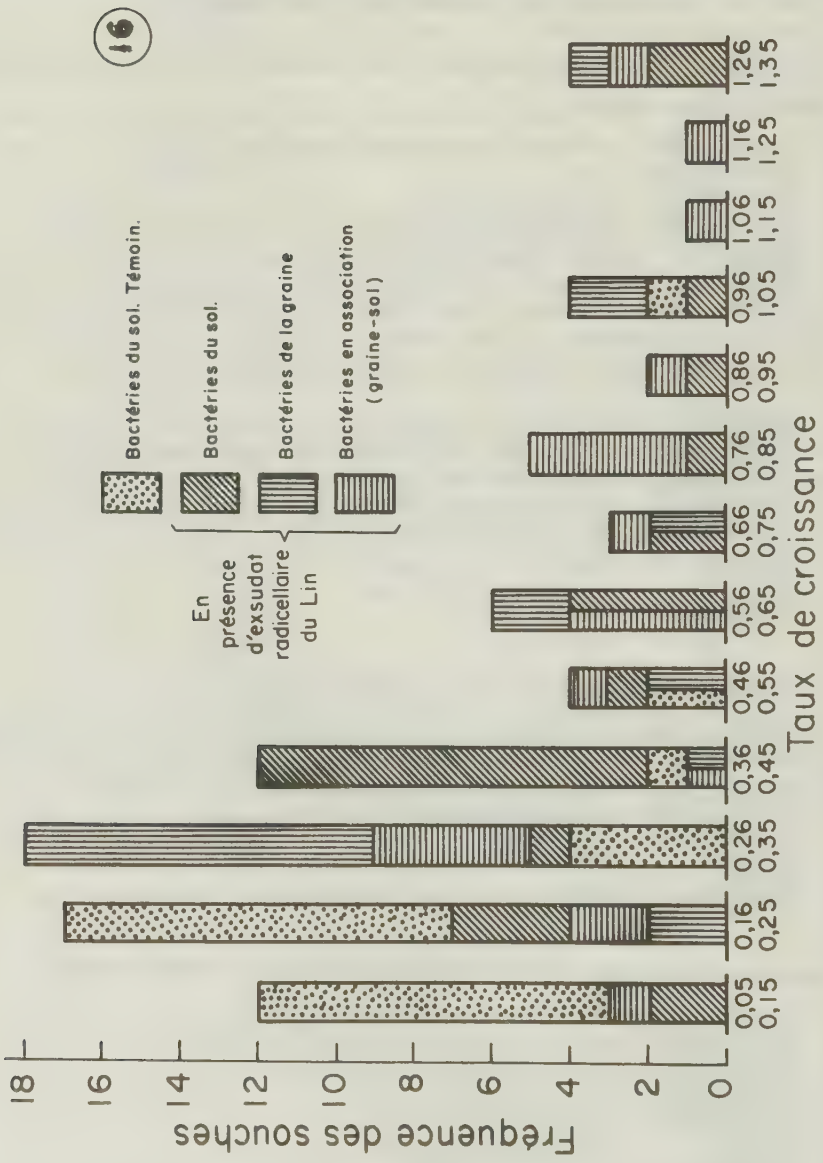
c) Bactéries de la graine en présence d'exsudats radicellaires de Lin :

Flavobacterium : 0,56 ; 0,56 ; 0,56 ; 0,56 ; 0,75. 0,75.
Empedobacter : 0,23 ; 0,28 ; 0,28 ; 0,28 ; 0,28 ; 0,28 ; 0,28 ; 0,30 ; 0,30 ; 0,30 ; 0,30 ; 0,30 ; 0,32 ; 0,32 ; 0,32 ; 0,33 ; 0,33 ; 0,37 ; 0,6.
Pseudomonas : 0,54 ; 0,60 ; 1,0 ; 1,0 ; 1,0 ; 1,3 ; 1,3 ; 1,3.
Acinetobacter : 0,33 ; 0,37 ; 0,75.
Achromobacter : 0,27.
Serratia : 0,19.
Bacillus : 1,0.
Arthrobacter : 0,50.

d) Bactéries de la graine et du sol en présence d'exsudats radicellaires de Lin :

Flavobacterium : 0,30 ; 0,33 ; 0,54 ; 0,56 ; 0,60 ; 0,60. 0,60.
Empedobacter : 0,10 ; 0,20 ; 0,30 ; 0,30 ; 0,33 ; 0,33 ; 0,33 ; 1,3.
Pseudomonas : 0,66 ; 0,66 ; 0,66 ; 0,85 ; 0,85 ; 1,3.
Acinetobacter : 0,14 ; 0,14 ; 0,17 ; 0,80.
Achromobacter : 0,25 ; 0,54 ; 0,60.
Serratia : 0,50 ; 0,50.
Bacillus : 0,75 ; 0,75 ; 1,0 ; 1,0.
Nocardia : 0,10 ; 0,26 ; 0,28.
Arthrobacter : 0,30 ; 0,40. 0,40; 0,40.

FREQUENCE DES SOUCHES BACTERIENNES EN FONCTION DE LEUR TAUX DE CROISSANCE



- Interprétation et discussion :

Les graphiques obtenus en groupant les souches appartenant à chacun des lots respectifs montrent que dans le sol, la majorité des espèces ont un taux de croissance faible. Au contraire, sous l'action des exsudats radicellaires prolifèrent surtout celles à croissance rapide car leur proportion est très forte dans la rhizosphère.

Il est à remarquer que les mesures des taux de croissance sont effectuées sur le même milieu (extrait de sol), qu'il s'agisse de l'un ou l'autre groupe, celui prélevé dans le sol ou celui de la rhizosphère.

La différence constatée ne peut donc provenir uniquement dans ce cas d'un effet de stimulation causé par les facteurs de la rhizosphère mais bien d'une sélection opérée par celle-ci. Cependant, on ne peut exclure qu'il y ait aussi une stimulation.

Quant à la nature de la sélection, deux hypothèses peuvent être formulées.

1)"L'effet rhizosphère" sélectionne préférentiellement des germes à taux de croissance élevé.

2) "L'effet rhizosphère" a stimulé le taux de croissance des bactéries telluriques, taux qu'elles auraient ultérieurement conservé même replacées dans les conditions où furent testées aussi bien les bactéries telluriques que rhizosphériques.

Ces deux opinions correspondent en réalité à deux aspects d'une sélection adaptation-mutation bactérienne, problème très général qui sort du cadre de ce travail.

Nous constatons aussi, que, parmi les souches à croissance rapide se classent surtout des Sporulales et des Pseudomonadaceae. On peut penser que les Sporulales se trouvant à l'état de spores dans le sol ont une phase de latence longue et de ce fait sont éliminées par les Pseudomonadaceae germes à phase de latence courte.

## CONCLUSIONS A LA DEUXIEME PARTIE

L'étude de la réaction de la microflore tellurique à la culture d'une plante en conditions hydroponiques a montré que cette réaction est comparable à celle qui a été observée dans le sol in situ.

Ce procédé simple nous a permis de réaliser au laboratoire dans des conditions expérimentales bien définies et reproductibles une sorte de rhizosphère artificielle.

Par cette méthode, nous avons pu montrer, par élimination des facteurs liés au sol, en particulier sa structure physique et sa composition chimique, que la plante, par ses produits d'excrétion, et la microflore tellurique étaient les déterminants essentiels de "l'effet rhizosphère".

L'étude comparative des souches isolées en culture hydroponique de la rhizosphère et du sol témoin, grâce à la technique que nous avons mise au point a permis de préciser l'action sélective exercée par "l'effet rhizosphère", sur les bactéries du sol.

Cette action sélective se traduit de la façon suivante : en ce qui concerne les types morphologiques, prédominent les bactéries Gram-négatifs, pigmentées, au détriment des cocci et formes filamenteuses (Micrococcaceae et Actinomycetaceae) ; ce fait a été relevé par la plupart des auteurs dans la rhizosphère d'autres plantes : LOCHHEAD (1940), KATZNELSON et ROUATT (1957), MACURA (1959). Nous devons signaler que nous n'avons pas trouvé comme ces derniers, une diminution des bactéries sporulées, mais notre sol étant lui-même peu riche en ces espèces, nous ne pouvons considérer comme significatif ce résultat. La caractérisation des genres bactériens sélectionnés nous a montré également que ces derniers appartenaient essentiellement à la famille des Pseudomonadaceae. Nous avons de plus précisé que cette répartition ne se faisait pas au hasard, mais s'orientait surtout vers les bactéries pigmentées appartenant aux genres Pseudomonas, Flavobacterium et Empedobacter.

Nous constatons que la sélection des bactéries dans la rhizosphère, milieu riche en composés organiques, joue cependant en faveur des souches à pouvoir de synthèse élevé. Cette constatation, qui a priori peut paraître paradoxale, peut s'expliquer par le fait que ces souches à grande indépendance nutritionnelle sont pour la plupart des souches à taux de croissance élevé. Les bactéries exigeant des acides aminés et des facteurs de croissance, qu'elles proviennent de la graine, du sol ou des deux microflores associées et qui semblaient devoir bénéficier des produits des excrétions radicellaires (a. aminés, facteurs de croissance, vitamines, etc.) se voient plutôt éliminées, en raison de leur lenteur de multiplication, par celles à taux de croissance élevé utilisant plus rapidement toutes les substances azotées mises à leur disposition par les racines.

Cette constatation se retrouve également chez les souches isolées du sol où dominent au contraire très largement des germes, à pouvoir de synthèse faible (78 %). Dans ce cas, ce sont encore les souches, peu nombreuses mais à pouvoir de synthèse élevé qui ont également le taux de croissance le plus haut. Ceci nous permet de déduire une corrélation, dans la sélection opérée, entre pouvoir de synthèse et taux de croissance.

Ce sont effectivement ces bactéries qui sont préférentiellement sélectionnées sous l'influence des sécrétions radicellaires si bien que, finalement, la sélection semble s'effectuer principalement par compétition entre souches à multiplication rapide et souches à multiplication lente.

# TROISIEME PARTIE

## ETUDE BIOCHIMIQUE

## ET ACTION DES EXSUDATS RADICELLAIRES

## SUR LES INTERRELATIONS MICROBIENNES DANS LA RHIZOSPHERE

La nature biochimique des plantules de Lin et de leurs excrétions a été en partie déterminée par la caractérisation des acides aminés libres, des acides organiques fixes et volatils, des sucres, des substances de croissance.

Nous avons ensuite étudié l'action des excrétions radicellaires et de certains de leurs composants, sur les bactéries de la rhizosphère.

Enfin, l'action de filtrats bactériens sur d'autres microorganismes a été également envisagée.

Chapitre VI

# ETUDE BIOCHIMIQUE DES EXCRETIONS RADICELLAIRES DU LIN

## 1. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Dès les premières études sur la rhizosphère, on pensa que la stimulation des microorganismes était due à la libération par les racines, de substances solubles facilement métabolisables.

Parmi les produits excrétés, les composés organiques sont les plus importants ; DYER (1894) en avait constaté l'existence chez plusieurs plantes : Orge, Blé, Avoine, Trèfle, Maïs, Haricot, etc. Puis les travaux de MAZE (1911), LYON et WILSON (1921), CRANNER (1922), MININA (1927) montrèrent que les racines cultivées en conditions aseptiques abandonnaient dans le milieu des acides organiques (acétique, formique, oxalique), des sucres réducteurs, des phosphatides et d'autres substances azotées non déterminées. VIRTANEN et coll. (1939) trouvant de fortes quantités d'amino-acides tels que l'acide aspartique, la alanine dans les nodules de légumineuses, élaborent toute une théorie sur la fixation de l'Azote, alors que BOND et BOYES (1939) n'admettent pas l'excrétion d'acides aminés par les racines de ces plantes.

Il faut attendre ces vingt dernières années, grâce à l'utilisation des méthodes chromatographiques et biochimiques pour avoir plus de précision sur la nature des excrétions radicellaires.

### A. OBTENTION DES EXSUDATS RADICELLAIRES.

En raison des difficultés de culture prolongée des plantes dans des conditions strictement aseptiques, la plupart des études ont été faites sur de jeunes plantules et nous sommes peu renseignés sur les excrétions de plantes adultes.

Plusieurs techniques que nous avons déjà mentionnées ont été utilisées (page 48 ). La plus courante, parce que la plus simple, est celle qui utilise de longs tubes de verre dans lesquels tiges et racines peuvent être maintenues en conditions stériles pendant quelques semaines.

Pour les études portant sur des stades plus avancés (floraison, tallage du Blé), les racines seules se développent en conditions stériles (RIVIERE 1959).

## B. COMPOSITION DES EXSUDATS RADICELLAIRES.

L'emploi des méthodes modernes allait non seulement confirmer les travaux anciens sur la présence de composés organiques azotés, mais aussi fournir une gamme beaucoup plus étendue de substances qui en raison de leur présence en quantité très faible avaient échappé aux méthodes de reconnaissance par des tests chimiques. Une revue de ces différents composés jusqu'ici rencontrés a été publiée par BORNER (1960), ROVIRA (1962). Les principales substances sont : des acides aminés, des sucres réducteurs, des acides organiques, des vitamines, des nucléotides, des flavones, des enzymes, des substances mucilagineuses et autres composés non identifiés, ces deux derniers groupes reconnus par leurs effets inhibiteurs ou stimulants sur les microorganismes de la rhizosphère.

### a) Les acides aminés.

C'est sur ces composés que les travaux sont les plus nombreux ; KANDLER (1951), à partir des racines excisées de Maïs, décèle huit acides aminés ou dérivés : asparagine, alanine, serine, a. aspartique, valine, ac.glutamique, leucine, glutamine et établit une proportionnalité entre leur concentration dans les racines et la quantité excrétée.

De même, dans le liquide périodiquement perfusé d'Avoine cultivée stérilement, PARKINSON (1955) détecte plusieurs acides aminés.

KATZNELSON et coll. (1954-1955) démontrent, sur des plantes cultivées en sable ou additionnées de sol, que celles-ci, amenées à leur point de flétrissement, puis réhumidifiées, libèrent, par cette alternance une plus grande quantité d'acides aminés. Toutefois, ces expériences étant conduites dans des conditions non stériles, il est possible que les produits de métabolisme des microorganismes jouent un rôle dans la nature et la quantité d'amino-acides décelés. Cependant, ces mêmes auteurs, en 1956, signalent que de petites quantités de substances "ninhydrine positives" étaient élaborées par des racines croissant aseptiquement. Ce qui indiquerait que des composés libérés au moment de la dessiccation sont probablement le résultat d'une excrétion directe.

RIVIERE (1959) étudie les excrétions radicellaires du Blé cultivées en conditions stériles jusqu'au tallage. A ce stade, la seule différence marquée repose sur une libération d'acides aminés en quantité bien plus importante que la bibliographie ne le laisse prévoir (ROVIRA, 1956).

Enfin, CARE (1959), dans une analyse systématique de l'exsudat de cent vingt espèces végétales appartenant à trente et une familles, tire les conclusions suivantes :

- L'excrétion des acides aminés est un phénomène constant quelle que soit la plante étudiée et l'époque envisagée.

- Les mêmes acides aminés se retrouvent chez le végétal adulte et la jeune plantule d'une même espèce.

- L'excrétion de certains acides aminés ne caractérise ni l'espèce, ni le genre, ni la famille.

Il faut encore signaler toute une série de travaux de ROVIRA (1956-1959) portant sur la nature et les conditions de l'excrétion des acides aminés. Non seulement la quantité totale et le nombre des composés parmi les espèces, mais aussi la proportion entre eux, varient d'une plante à une autre. C'est ainsi que des plantules de pois âgées de vingt et un jours libèrent 22 amino-acides ou dérivés, homoserine, thréonine, glutamine, asparagine, alanine étant les plus abondants, alors que 14 seulement sont détectés chez l'Avoine, représentés surtout par le glycocolle, la serine, la lysine.

Parmi les facteurs influençant la libération de ces composés, l'auteur retient : l'âge de la plante car la quantité d'amino-acides exsudés est plus importante durant les deux premières semaines que les deux suivantes ; l'intensité lumineuse et la température, leurs variations provoquant l'augmentation de certains amino-acides et la diminution d'autres, faits également observés par BALICKA et coll. (1962) ; la présence de microorganismes car elle modifie la concentration des acides aminés en solution près des racines ; par contre, le taux de calcium et l'aération ont une faible action.

b) Les sucres réducteurs.

Leur présence n'a pas toujours été révélée : CARE (1959) dans les eaux de cultures concentrées des cent vingt espèces végétales étudiées n'a pu les mettre en évidence. Il faut donc supposer que ces substances organiques ne sont pas toujours présentes dans les excrétions radicellaires ou, si elles le sont, c'est à doses faibles non identifiables par les méthodes chromatographiques.

Quelques travaux sur leur existence peuvent être signalés cependant : LUNDEGARDH et STENLID (1944) trouvent du glucose à partir de racines de Blé excisées. KATZNELSON et coll. (1955) observent la présence d'un composé réducteur ayant un Rf identique à celui du glucose, mais seulement lorsque les plantes sont soumises alternativement à une phase de dessiccation suivie d'une réhumification. ROVIRA (1956) met en évidence du glucose et du fructose dans les eaux de culture du Pois et de l'Avoine âgées de 10 jours, mais n'en trouve plus chez les plantules âgées de 21 jours. BHUVANESWARI et SUBBA RAO (1957) révèlent la présence de xylose, glucose, fructose, maltose dans les excrétions du sorgho et de la moutarde. RIVIERE (1959) décèle, contrairement aux autres auteurs, des quantités notables de sucre, dans les excrétions de Blé au moment du tallage : du glucose de l'ordre de 0,1 mg par plante, des traces d'arabinose, de xylose,de raffinose et un aldose inconnu.

SCHROTH et SNYDER (1961), dans les eaux de lavage d'hypocotyles excisés de haricots âgés de 5 jours, met en évidence du glucose, du fructose, du saccharose et du maltose.

c) Les acides organiques.

Il y a peu de résultats. Pour CARE (1959), l'excrétion des acides organiques n'est pas constante chez toutes les plantes et même dans une espèce donnée. En général, leur présence se manifeste aussitôt après la germination et durant une huitaine de jours. A une période plus avancée, ils ne se rencontrent plus. Néanmoins, les travaux de RIVIERE (1959) semblent prouver le contraire puisque c'est à la fin du tallage du Blé qu'il rencontre en quantités dosables des acides gras volatils (acétique, propionique, butyrique, valérianique), des acides non volatils (malique, lactique, tartrique, citrique, succinique, fumarique, glycolique).

d) Les vitamines.

Du fait que de nombreuses bactéries exigent des vitamines pour leur croissance, la présence de celles-ci fut longtemps soupçonnée dans les extraits racinaires.

Une méthode microbiologique suggérée par SCHOPFER (1935) a permis l'identification des principales vitamines du groupe B, mais les résultats publiés restent encore sommaires.

WEST (1939), TIMONIN (1941) trouvent de la biotine et de la thiamine dans les excrétions de Lin. La présence de ces deux vitamines est également signalée par MESHKOV (1952), KRASSILNIKOV (1955), la proportion respective de chacune d'elles diffère avec le végétal, et la quantité sécrétée avec le stade de croissance.

Une étude de ROVIRA et HARRIS (1961) portant sur dix plantes différentes, légumineuses et autres, montre que la biotine, l'acide pantothénique, l'acide nicotinique sont présents dans tous les exsudats. La riboflavine et la thiamine ne se rencontrent pas toujours, la pyridoxine n'a jamais été détectée.

e) Autres substances.

Parmi les composés encore isolés des sécrétions radicellaires, il faut citer des bases puriques : adénine, guanine, décelées chez le Pois et l'Avoine par LUNDEGARDH et STENLID (1944). FRIES et FORSMAN (1951) y ajoutent, pour le Pois, des bases pyrimidiques, des hétérosides : l'un sous la forme d'un dérivé de l'acide coumarique pour l'Avoine, l'autre la linamaroside du Lin dont TIMONIN (1941) retrouve l'acide cyanhydrique dans les exsudats. Des substances fluorescentes, des composés absorbant les rayons ultraviolets ont été relevés par EBERHARDT (1955), ROVIRA (1956).

Cette brève revue montre clairement que les excrétions radicellaires contribuent à elles seules à former un ensemble de conditions qui, par échange de substances actives variées, facilement métabolisables, peuvent influencer les microorganismes. Les bactéries à pouvoir de synthèse faible pourraient en être les premières bénéficiaires (LOCHHEAD et CHASE, 1943).

METZ (1955) attribuent une grande importance à l'action des cellules exfoliées qui, lors de leur décomposition, pourrait constituer un supplément nutritif non négligeable pour les microorganismes. Ceci semblerait particulièrement vrai dans les cultures âgées. ROVIRA (1956) note qu'après 10 jours de culture, le poids sec du végétal est trois à quatre fois celui des débris cellulaires mais, au bout de 21 jours, il n'en est plus que le double. Peut-être peut-on y voir aussi une explication du changement de population microbienne avec la croissance de la plante.

Tous ces travaux nous amènent à penser que l'étude de la rhizosphère d'une plante nécessite l'analyse de ses excrétions radicellaires, si l'on veut comprendre les interactions entre la plante et les microorganismes.

## 2. RECHERCHES SUR LA COMPOSITION DES SECRETIONS RADICELLAIRES DU LIN

Notre but est d'apporter une appréciation qualitative et comparative des substances organiques hydro-alcoolo-solubles dans les plantules entières et de celles qui, sécrétées par les racines, peuvent être utilisées par les microorganismes, à savoir : les acides aminés, les acides organiques fixes et volatils, les sucres et les facteurs de croissance.

### A. PREPARATION DES EXTRAITS.

Les plantes ont été cultivées aseptiquement en milieu liquide. Les graines de Lin désinfectées à l'hypochlorite de Ca, sont soumises aux conditions hydroponiques décrites dans le chapitre précédent, la durée de culture étant de trois semaines.

A la période désirée, les plantules et leurs racines sont soigneusement retirées des tubes et égouttées. Les tubes présentant un milieu de culture trouble sont éliminés.

Les plantules sont comptées, puis mises à sécher à l'air libre pendant cinq jours. Le matériel sec est ensuite finement broyé au mortier, porté à nouveau dans un dessiccateur en présence de $CaCl_2$, puis pesé :

196 plantules ont fourni 1,42 g de matière sèche, soit 7,2 mg en moyenne par plantule.

Le liquide de culture renfermant les composés excrétés par les racines est recueilli, filtré, concentré sous pression réduite, à un volume tel que 1 ml de filtrat corresponde à la sécrétion d'une plantule.

## B. EXTRACTION DES SUBSTANCES ORGANIQUES HYDRO-ALCOOLO-SOLUBLES DES PLANTULES ENTIERES.

La masse de substance sèche utilisée pour cette extraction a été calculée pour que la quantité déposée sur le chromatogramme corresponde environ à la composition d'une plantule.

a) Fixation du matériel végétal.

Elle se fait à l'alcool à 95°.

300 mg de substance mélangés à 30 ml d'alcool à 95° sont portés à ébullition pendant 15 minutes dans un bain-marie bouillant sous réfrigérant à reflux. On centrifuge ensuite, le surnageant est décanté et le résidu conservé pour l'extraction.

b) Extraction hydro-alcoolique.

Le résidu repris par 30 ml d'alcool est soumis à une ébullition pendant 5 minutes sous réfrigérant. On centrifuge 10 minutes, puis on recueille le surnageant contenant les substances organiques.

Cette extraction est répétée trois fois.

Tous les surnageants sont ensuite réunis, évaporés à sec, et repris par 30 ml d'eau tiède.

## C. SEPARATION DES DIVERS COMPOSES.

Les extraits des plantules entières et les liquides de culture sont respectivement passés sur une colonne de résine cationique (DOWEX 50). Sur cette colonne sont retenus, en plus des cations minéraux, les acides aminés. Le liquide effluent renferme les anions minéraux, les acides organiques et les sucres. Les sucres sont séparés des acides organiques par passage sur une colonne anionique (Amberlite IR4B). A la sortie, les sucres seuls sont recueillis.

a) Identification des acides aminés.

Les acides aminés retenus sur la résine DOWEX 50 sont élués par 150 ml de $NH_4OH$ N.

L'ammoniaque est éliminé par évaporation sous vide et le résidu repris par de l'eau distillée.

En ce qui concerne l'extrait des plantules entières, cette reprise se fait dans 5 ml, et l'on dépose 100 µl sur le chromatogramme (volume correspondant sensiblement aux constituants d'une plantule).

Le liquide de culture contenant les substances excrétées est concentré au sortir de la colonne au 1/25 de son volume initial, ce qui revient à dire que 1/25 de ml correspond à l'excrétion d'une plantule. 100 µl de cette solution sont nécessaires pour obtenir des traces visibles sur la chromatogramme.

- Techniques chromatographiques.

Nous avons utilisé : la chromatographie bidimensionnelle, et la chromatographie unidimensionnelle selon la méthode de Mc FARREN (1951).

Pour la chromatographie bidimensionnelle, nous avons employé le papier Whatman n° 1 et les solvants suivants :

Première dimension : butanol acétique, eau (4-1-5) pendant 20 h à 22° C.
Deuxième dimension : phénol-eau V/V + ammoniaque 5 % pendant 18 h à 22°C.

La méthode chromatographique unidimensionnelle de Mc FARREN consiste à obtenir une première séparation de groupes sur papier Wathman n°1 avec : butanol-acide formique-eau (75-15-10 en volumes). On obtient ainsi six taches bien différenciées correspondant respectivement à la cystine, au groupe des bases et à quatre autres groupes nettement distincts. Chaque tache est repérée en lumière de Wood, découpée, puis éluée en eau distillée.

Dans une deuxieme séparation, on se sert de papiers Wathman 4 imprégnés au préalable par des mélanges tampon à différents pH avec le phénol saturé par le même tampon qui a servi à imprégner le papier.

Dans chacun des cas, un deuxième chromatogramme est réalisé dans les mêmes conditions avec des acides aminés témoins.

Tous les chromatogrammes sont séchés à l'air. On pulvérise ainsi sur chacun d'eux une solution de ninhydrine à 0,2 % dans le butanol et l'on porte à l'étuve à 105° pendant 10 minutes. Par superposition de la feuille témoin, on peut procéder à l'identification.

b) Identification des acides organiques.

1. Acides volatils : Ils sont tirés directement de l'exsudat et des extraits de plantules par entraînement à la vapeur en présence d'acide tartrique.

Les cations sont éliminés par passage sur permutite. Après concentration à froid, les acides sont transformés en sels de morpholine et chromatographiés sur papier Wathman n° 3 en présence du solvant butanol-cyclohexane-propylèneglycol-ammoniaque-morpholine-eau (30-30-10-0,07-0,5-3,7). Après séchage du chromatogramme à l'air libre, on révèle par pulvérisation d'une solution alcoolique de O-crésol-sulfone-phtaléine tamponnée par le véronal sodique (OSTEUX, GUILLAUME et LATURAZE, 1958).

2. Acides fixes : Après élimination des acides aminés sur Dowex, l'effluent est lui-même passé sur Amberlite IR4B. Les acides organiques sont élués sous forme de sels de sodium par Na OH N que l'on ramène à l'état d'acides par passage sur Dowex. On les sépare par chromatographie bidimensionnelle sur papier Wathmen n° 1 avec les solvants suivants :

Première dimension : éthanol-$NH_4$ OH-eau (80-5-15)
Deuxième dimension : butanol-a. acétique-eau (10-3-10)

Après séchage, ils sont révélés par pulvérisation d'une solution alcoolique de vert de bromocrésol à 4 %.

c) Identification des sucres :

Passé sur résine Dowex, puis sur Amberlite, l'effluent ne contient plus que les sucres. La solution est concentrée sous vide à 30° environ. On utilise la chromatographie à une seule dimension sur papier Arches 310, avec le solvant butanol-éthanol-eau (4-1,1-1,9).

Après 20 heures de migration et séchage à l'air libre, on révèle les spots par le réactif à l'urée chlorhydrique de DEDONDER (1952) qui permet de révéler tous les sucres sur un même chromatogramme. Les aldoses et les aldopentoses sont d'abord révélés par le réactif au phtalate d'aniline, puis les cétoses par le réactif à l'urée chlorhydrique.

La pulvérisation des réactifs sur le papier est suivie d'un chauffage de quelques minutes à 120°C. Les cétoses apparaissent comme des taches gris-bleu virant au brun. A l'aide de sucres témoins, on détermine la position des taches.

d) Identification des facteurs de croissance par voie biologique :

La méthode de COOK et LOCHHEAD (1959) est basée sur la croissance d'un certain nombre de souches-tests dans des milieux renfermant, pour chacune d'elles, tous les métabolites essentiels à leur nutrition à l'exception d'un seul : celui qui fait l'objet de la recherche. Dans un tel milieu, la culture n'est rendue possible que si le filtrat ajouté contient le métabolite en question.

1. Mode opératoire :

Pour chacune des souches-tests, nous devons disposer :

- d'un témoin "négatif" constitué par une série de tubes contenant le milieu approprié avec tous les facteurs nécessaires à la souche moins celui à caractériser. Dans ce milieu, la souche ne prolifère pas.

- d'un témoin "positif" constitué par une série de tubes contenant le même milieu avec tous les facteurs exigés par la souche. Dans ce milieu, la souche prolifère.

- d'une série de tubes contenant le même milieu avec tous les facteurs nécessaires, moins celui à caractériser, plus le filtrat à tester. Si ce filtrat renferme le facteur recherché, la souche prolifèrera, au contraire si le facteur y est absent, il n'y aura pas de croissance bactérienne.

2. Préparation des milieux :

Le milieu de base est constitué par des sels minéraux, du glucose et du "Casaminoacids vitamine free" (Difco) :

| | | |
|---|---|---|
| Phosphate bipotassique | 1 | g |
| Nitrate de potassium | 0,5 | g |
| Sulfate de magnésium | 0,2 | g |
| Chlorure de calcium | 0,1 | g |
| Chlorure de sodium | 0,1 | g |
| Solution Perchlorure de fer à 28 % | 0,1 | ml |
| Eau distillée | 1000 | ml |

La solution est ajustée à pH 6,8, portée à ébullition, refroidie et filtrée. On ajoute ensuite :

| | |
|---|---|
| Glucose | 1 g |
| Casaminoacids vitamine free (Difco) | 1 g |

Répartir en tubes de 17 mm à raison de 5 ml par tube. Boucher au coton ; stériliser 20 minutes à 110°C.

Les solutions de facteurs de croissance sont préparées aux doses respectives de 50 µg pour la Thiamine, la Pyridoxine, le Pantothenate de Ca, l'acide Nicotinique ; de 10 µg pour l'acide Folique ; de 0,2 µg pour la vitamine $B_{12}$ ; de 0,1 µg pour la Biotine, doses que l'on dissout respectivement dans 100 ml d'eau distillée. Chacune de ces solutions est filtrée sur bougie Chamberland $L_3$, puis répartie stérilement à raison de 0,5 ml dans le tube de milieu où le facteur est nécessaire.

Le tableau XV indique la constitution chimique en métabolites essentiels des témoin "négatif" et témoin "positif" pour chacune des souches.

Tableau XV

SOUCHES TESTS ET MILIEUX DE CONTROLE POUR LA DETECTION DES FACTEURS DE CROISSANCE DANS LES FILTRATS DE CULTURE
(vitamines à ajouter au milieu minéral additionné de glucose et "casaminoacids", vitamine free)

| Souches-tests (de COOK et LOCHHEAD) | Facteurs recherchés | Milieux de contrôle | |
|---|---|---|---|
| | | Témoin "négatif" | Témoin "positif" |
| 824 | Thiamine | 0 | + Thiamine |
| 54 | Biotine | Thiamine<br>Vitamine $B_{12}$ | + Biotine |
| S 101 | Ac. Pantothénique | Thiamine<br>Biotine | + Pantothénate de Ca |
| GR 28 | Ac. Folique | Thiamine<br>Biotine<br>Pantothenate de Ca<br>Ac. Nicotinique | + Ac. Folique |
| Ci 3 | Ac. Nicotinique | Thiamine<br>Biotine<br>Pantothénate de Ca<br>Ac. Folique | + Ac. Nicotinique |
| 785 | Riboflavine | 0 | + Riboflavine |
| GR 94 | Pyridoxine | Thiamine<br>Biotine<br>Pantothénate de Ca<br>Ac. Folique<br>Ac. Nicotinique | + Pyridoxine |
| 541 | Vitamine $B_{12}$ | Yeast extract | + Vitamine $B_{12}$ |

Nous tenons à remercier ici Mr A. G. LOCHHEAD qui nous les a fournies

La troisième série de tubes, de même composition que le "témoin négatif", reçoit 1 ml du filtrat préalablement stérilisé sur bougie $L_3$ dans lequel le facteur de croissance est recherché.

Trois tubes sont donc nécessaires par souche. On ensemence chaque série avec les souches appropriées. Deux repiquages successifs sont nécessaires pour éliminer toutes traces de substances organiques étrangères qui auraient pu être apportées par l'ensemencement. Tous les tubes sont mis à l'étuve à 28°. Après cinq jours, la culture est appréciée. Toutes les expériences ont été conduites en double.

## D. RESULTATS EXPERIMENTAUX.

a) Identification des acides aminés par chromatographie.

1. Extrait hydro-alcoolique des plantules entières :

100 µl d'extrait correspond nt à 6 mg de matière sèche ont permis de mettre en évidence les acides aminés ou dérivés suivants :

a. aspartique, a. glutamique, sérine, asparagine, glutamine, glycocolle, thréonine, alanine, β alanine, a. amino-butyrique, arginine, lysine, proline, valine, leucine et d'une façon plus incertaine méthionine tyrosine, histidine , ces derniers ne s'étant pas révélés par la méthode de Mc FARREN.

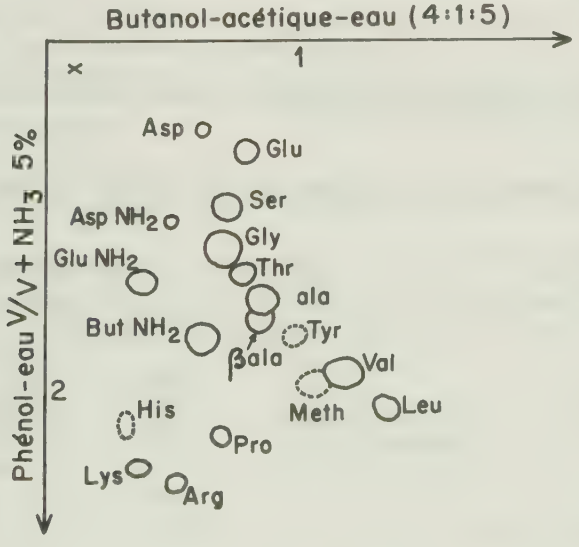



Fig. 17 : Chromatogramme bidimensionnel montrant la position des différents acides aminés dans les plantules entières.

2. Liquide d'excrétion des racines :

100 µl d'exsudat ramenés à un volume tel que 1/25 de ml correspond à la sécrétion d'une plantule a révélé les acides aminés suivants :

a. aspartique, a. glutamique, sérine, glutamine, glycocolle, β alanine, arginine, valine, leucine et d'une façon incertaine thréonine, lysine, tyrosine.

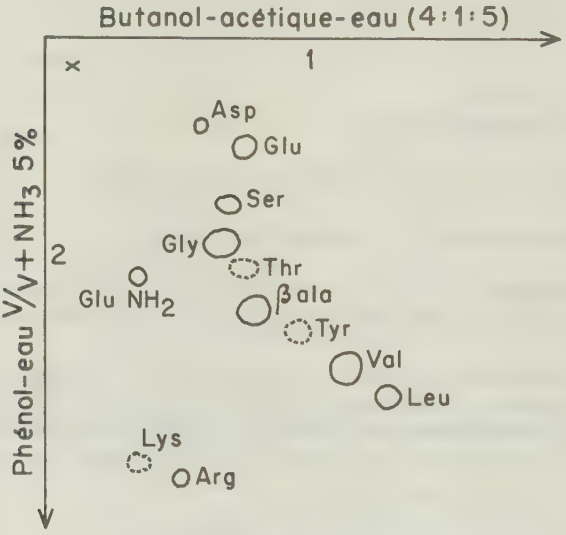



Fig. 18 : Chromatogramme bidimensionnel des différents acides aminés d'exsudat radicellaire de lin.

b) Identification des acides organiques par chromatographie :

- Acides volatils :

Dans l'extrait hydro-alcoolique de plantules entières comme dans le liquide d'excrétion, nous avons pu détecter la présence des acides suivants :

Acide formique
Acide acétique
Acide butyrique

- Acides fixes :

L'extrait hydro-alcoolique des plantules entières a révélé :

L'acide oxalique
L'acide tartrique

L'acide citrique
L'acide malique
L'acide lactique (d'une façon incertaine)

Le liquide d'excrétion a fourni à l'état de traces :

L'acide oxalique
L'acide citrique
L'acide tartrique (d'une façon incertaine)
L'acide lactique (d'une façon incertaine°

c) Identification des sucres par chromatographie.

L'extrait hydro-alcoolique des plantules entières a permis de mettre en évidence :

Le raffinose
Le saccharose
Le glucose
Le fructose

Le liquide d'excrétion ne renferme pas de sucre réducteur, la réaction de Molisch est toujours restée négative.

d) Identification des facteurs de croissance par la méthode biologique.

L'extrait hydro-alcoolique des plantules et le liquide d'excrétion radicellaire ont donné les mêmes résultats.

1 ml de chacun d'eux ont été respectivement introduits dans un tube de milieu "Témoin négatif".

Après 5 jours de culture à 28°, on apprécie la croissance bactérienne de chaque tube.

| Vitamine recherchée | Souche test | Témoin - | Témoin + | Témoin négatif + 1 ml d'exsudat radicellaire |
|---|---|---|---|---|
| Riboflavine | 785 | - | ++ | + + |
| Biotine | 54 | - | ++ | + + |
| Thiamine | 824 | - | ++ | + |
| Ac. Pantothénique | 101 | - | ++ | + + |
| Ac. Folique | 28 | - | ++ | + + |
| Ac. Nicotinique | Ci 3 | - | ++ | + + |
| Vitamine $B_{12}$ | 541 | - | ++ | - |
| Pyridoxine | 94 | - | ++ | - |

Tableau XVI

SUBSTANCES MISES EN EVIDENCE DANS LES EXTRAITS HYDRO-ALCOOLO-SOLUBLES DES PLANTULES ENTIERES ET DE L'EXSUDAT RADICELLAIRE

| Composés recherchés | Extraits hydro-alcoolo-solubles de plantules entières | Exsudat radicellaire |
|---|---|---|
| Acides aminés | Acide Aspartique | |
| | Acide Glutamique | |
| | Serine | |
| | Asparagine | Acide Aspartique |
| | Glutamine | Acide Glutamique |
| | Glycocolle | Sérine |
| | Thréonine | Glutamine |
| | alanine | Glycocolle |
| | alanine | alanine |
| | A. Amino-butyrique | Arginine |
| | Arginine | Valine |
| | Lysine | Leucine |
| | Proline | Thréonine ? |
| | Valine | Lysine ? |
| | Leucine | Tyrosine ? |
| | Méthionine ? | |
| | Tyrosine ? | |
| | Histidine ? | |
| Acides organiques fixes | Acide Oxalique | Acide Oxalique |
| | Acide Tartrique | Acide Tartrique ? |
| | Acide Citrique | Acide Citrique |
| | Acide Malique | Acide Lactique ? |
| | Acide Lactique | |
| Acides organiques volatils | Acide Formique | Acide Formique |
| | Acide Acétique | Acide Acétique |
| | Acide Butyrique | Acide Butyrique |
| Sucres | Raffinose | |
| | Saccharose | Aucun sucre décelable |
| | Glucose | |
| | Fructose | |
| Facteurs de croissance | Riboflavine | Riboflavine |
| | Biotine | Biotine |
| | Thiamine | Thiamine |
| | Ac. Pantothénique | Ac. Pantothénique |
| | Ac. Folique | Ac. Folique |
| | Ac. Nicotinique | Ac. Nicotinique |

- Interprétation et discussion.

Le tableau XVI, qui résume l'ensemble des résultats, montre :

1) Que la plupart des composés recherchés dans les extraits hydro-alcooliques des plantules entières se retrouvent dans les exsudats des racines. Pour ceux qui n'ont pas été retrouvés (les sucres et certains acides aminés), il faut admettre que ceux-ci, par leur faible teneur, sont totalement utilisés par les réactions métaboliques de la plantule, ou qu'ils n'apparaissent pas dans les exsudats avec les méthodes utilisées.

2) Que les plantules de Lin aux tout premiers stades de croissance, en culture hydroponique, sont capables d'excréter dans le milieu de nombreuses substances organiques variées, facilement utilisables par les microorganismes.

Il se confirme donc, que le milieu de la rhizosphère est beaucoup plus riche, du point de vue nutritionnel, que le sol banal où les germes doivent surtout puiser leur source d'énergie dans des réserves organiques très complexes (humus) difficilement métabolisables. Ceci renforce la conclusion du précédent chapitre selon laquelle le facteur sélectif de la rhizosphère est le taux de croissance des germes présents.

Chapitre VII

# ACTION DES EXSUDATS RADICELLAIRES ET DE CERTAINS FILTRATS BACTERIENS SUR L'EQUILIBRE MICROBIEN DE LA RHIZOSPHERE DU LIN

## 1. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Si les techniques modernes ont permis de mettre en évidence un grand nombre de molécules organiques diverses dans les exsudats radicellaires, leur action vis-à-vis des microorganismes reste encore à préciser.

Rappelons ici les travaux de WEST (1939), démontrant que les excrétions des racines du Lin pourraient suppléer aux besoins en thiamine et en biotine de Micrococcus aureus et Rhizobium trifolii, mais cet auteur n'étend pas son étude à d'autres espèces de bactéries plus représentatives de la flore tellurique. Egalement, ceux de l'école canadienne qui, par la recherche des exigences nutritionnelles des germes isolés de la rhizosphère, élucident indirectement le rôle des acides aminés et des substances de croissance des exsudats radicellaires. Ces résultats sont confirmés en partie par ROVIRA (1956) en faisant agir des exsudats radicellaires de Pois et d'Avoine sur des germes isolés du sol et de la rhizosphère. De plus, cet auteur, après avoir isolé des bactéries de milieux minéraux contenant soit des amino-acides, soit de l'extrait de levure, a montré que, selon les germes, l'addition d'exsudats à ces différents milieux provoque une stimulation comparable, suggérant ainsi la présence de constituants communs. Dans d'autres cas, la croissance de bactéries proliférant dans un milieu contenant de l'extrait de levure, augmente en présence d'exsudats prouvant que ceux-ci contiennent des facteurs absents dans l'extrait de levure. Enfin, les excrétions ne peuvent être complètement remplacées par le glucose, l'extrait de sol, l'hydrolysat de caséine ou un mélange synthétique de facteurs de croissance connus, ce qui laisse supposer que d'autres substances pourraient être responsables de la stimulation de certains microorganismes.

Une action sélective des exsudats radicellaires au sein non plus de groupes, mais d'espèces bactériennes a pu être démontrée par CHAN et coll. (1963). Ces auteurs observent le comportement d'un mélange de cinq organismes du sol : Agrobacterium radiobacter, Arthrobacter citreus, Azotobacter chroococcum, Bacillus cereus et Pseudomonas cultivés dans un milieu additionné d'extraits radicellaires; A. citreus prédomine ou est

n nombre égal aux formes à Gram négatif (Pseudomonas et Agrobacte-um) dans l'extrait de sol ; en présence d'exsudat, Pseudomonas est ettement prédominant sur A. citreus tandis que B. cereus et A. chroo-occum sont rarement présents.

Cependant, si stimulation et sélection microbiennes au sein de la rhi-osphère peuvent être attribuées en grande partie aux sécrétions radicel-ires des plantes, LOCHHEAD et THEXTON (1947) ont démontré que ,7 % des filtrats de culture de bactéries à haut pouvoir de synthèse, ermes également stimulés dans la rhizosphère, permettent la prolifera-on de bactéries exigeant des acides aminés pour leur croissance. PAY-E, ROUATT et LOCHHEAD (1957) ont pu isoler de ces filtrats, sans utefois les identifier, des substances donnant une réaction positive à la nhydrine.

Ces travaux, repris par VAGNEROVA et VANCURA (1962), ont précisé ue le nombre d'amino-acides rencontrés dans les filtrats de 11 espèces icrobiennes différentes cultivées sur un milieu salin avec azote minéral, arie de 3 à 13. L'asparagine, la sérine, l'a. aspartique, l'$\alpha$-alanine et méthionine, y sont les plus fréquents. La présence de méthionine, et rfois de faibles quantités de cystéine dans 8 filtrats sur 11 confirment mportance de a. aminés renfermant un groupement sulfure souligné par ALLACE et LOCHHEAD (1950). A l'aide de souches-test exigeant pour ur croissance des amino-acides ou des amino-acides associés à des vi-mines, les auteurs ont montré que les filtrats contenant des amino-cides soufrés sont préférentiellement utilisés par la majorité des souches écessitant des acides aminés.

La prolifération, dans quelques filtrats de culture, de bactéries exi-eant des vitamines, prouve que ces filtrats contiennent également des vi-mines. Cette dernière constatation vient à l'appui de travaux antérieurs : es facteurs de croissance tels que thiamine, biotine, riboflavine, a. pa-aminobenzoïque, a. nicotinique, a. pantothénique, a. folique, vitamine 12 ont pu être détectés dans les cultures bactériennes (JONES et GREA-ES, 1943 ; BURTON et LOCHHEAD, 1951 ; LOCHHEAD, 1952 ; LOCH-EAD et BURTON, 1955 ; ROVIRA et HARRIS, 1961). Enfin, une souche Bacillus cereus n'utilise aucun des filtrats.

## 2. RECHERCHES SUR LES INTERACTIONS MICROBIENNES DANS LA RHIZOSPHERE DU LIN

Le but de nos recherches a été :

- de préciser si la présence d'exsudats radicellaires et particulière-ent les amino-acides de ceux-ci, avaient une réaction sur les bactéries pouvoir de synthèse élevé, germes les plus représentés dans la rhizo-hère.

- de déterminer dans quelle mesure, chez les bactéries nécessitant des

acides aminés ou des acides aminés associés à des facteurs plus complexes, les excrétions radicellaires ne pourraient être supplées par les filtrats de culture des bactéries à pouvoir de synthèse élevé.

## A. TECHNIQUES UTILISEES.

### a) Préparation de l'exsudat radicellaire.

- Exsudat total : il est obtenu par cultures stériles de plantules de Lin pendant un mois (voir page 89 ). Après élimination des plantules, le liquide de culture est évaporé sous vide à 40° et repris dans un volume d'eau distillée tel que 1 ml corresponde à la composition d'une plantule. La solution est stérilisée par filtration sur bougie CHAMBERLAND $L_3$.

- Extraction des amino-acides de l'exsudat : nous avons utilisé la technique de fractionnement sur résine cationique décrite page 91 . Après élimination de l'ammoniaque, le résidu est repris par un volume d'eau distillée correspondant au volume initial de l'exsudat utilisé.

### b) Croissance des souches bactériennes à pouvoir de synthèse élevé en présence d'exsudat de Lin et de sa "fraction aminée".

Dans les 6 cuves d'un biophotomètre de BONNET et MAURY, on introduit 6 ml du milieu minéral nitrate-glucose, on stérilise 20 minutes à 112°.

On ajoute stérilement 1 ml d'exsudat dans 2 cuves, 1 ml de la "fraction aminée", dans deux autres ; 1 ml d'eau distillée dans les deux dernières qui servent de témoin.

Chaque cuve est ensemencée avec 0,7 ml de suspension en milieu liquide nitrate-glucose âgée de 24 heures. La croissance est enregistrée au biophotomètre.

### c) Préparation des filtrats bactériens.

Onze souches ont été choisies parmi celles isolées à partir de la microflore de la graine, du sol et de la rhizosphère :

| | |
|---|---|
| Bacillus megatherium | 34 (isolée de la rhizosphère) |
| Bacillus megatherium | 22 (isolée du sol) |
| Pseudomonas fluorescens | 16 (isolée de la rhizosphère) |
| Pseudomonas fluorescens | 21 (isolée de la rhizosphère) |
| Flavobacterium aurantiaca | 12 (isolée de la graine) |
| Flavobacterium aurantiaca | 13 (isolée du sol) |
| Flavobacterium aurantiaca | 18 (isolée de la rhizosphère) |
| Empedobacter fucatum | 22 (isolée de la graine) |
| Achromobacter rathonis | 37 (isolée du sol) |
| Acinetobacter stationis | 41 (isolée du sol) |
| Serratia ruber | 10 (isolée de la rhizosphère |

- Milieu de culture : on utilise le milieu minéral de base de LOCHHEAD (1940) (voir page 67 ) que l'on répartit en fioles Erlenmeyer de 1 litre à raison de 150 ml par fiole. On stérilise à 112° pendant 20 minutes.

- Culture des microorganismes : on ensemence chacun des organismes cités et la culture est poursuivie en agitation continue à 30° pendant 6 jours.

- Stérilisation des filtrats : les filtrats sont obtenus par une première filtration sur filtre DURIEUX ou une centrifugation lorsque le germe est trop muqueux, suivie d'une deuxième filtration sur bougie CHAMBERLAND $L_3$ qui retient les corps microbiens.

- Recherche de substances ninhydrine positive dans les filtrats : tous les filtrats utilisés ont réagi positivement à la ninhydrine.

d) Préparation et ensemencement des milieux additionnés de filtrats bactériens ou d'exsudat radicellaire.

On utilise toujours le même milieu minéral (LOCHHEAD) que l'on répartit en tubes de 17 mm à raison de 4 ml par tube.

Pour chaque souche à tester, on dispose 2 de ces tubes contenant respectivement soit 1 ml d'exsudat, soit 1 ml de chacun des filtrats bactériens ajoutés stérilement.

L'ensemencement est pratiqué au fil de platine, deux repiquages sont nécessaires. Il faut donc utiliser 2 séries de 12 tubes par souche. Les résultats sont fournis par appréciation d'un trouble lorsque la culture est possible.

## B. RESULTATS EXPERIMENTAUX.

a) Action de l'exsudat radicellaire et de sa "fraction aminée" sur la croissance des souches à haut pouvoir de synthèse.

Nous avons utilisé les souches suivantes :

Bacillus megatherium
Pseudomonas fluorescens
Flavobacterium aurantiaca
Empedobacter fucatum
Serratia ruber

Les résultats se traduisent par les courbes suivantes : figures 19 à 23.

- Interprétation et discussion.

Nous constatons que la présence d'exsudat radicellaire peut avoir aussi une action stimulante sur les germes à pouvoir de synthèse élevé.

ACTIONS DE L'EXSUDAT RADICELLAIRE DE LIN
ET DE SA "FRACTION AMINEE" SUR DIVERSES BACTERIES

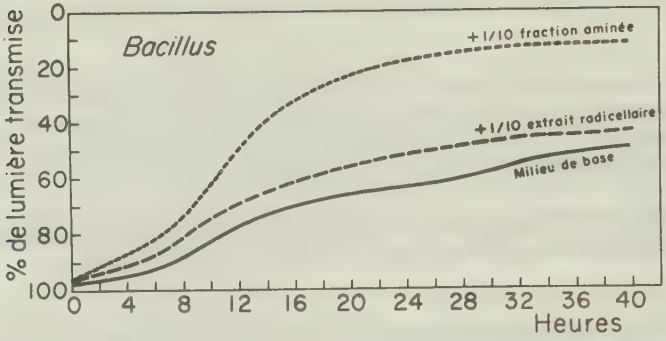



Fig. 19 : Actions sur une souche de B. megatherium

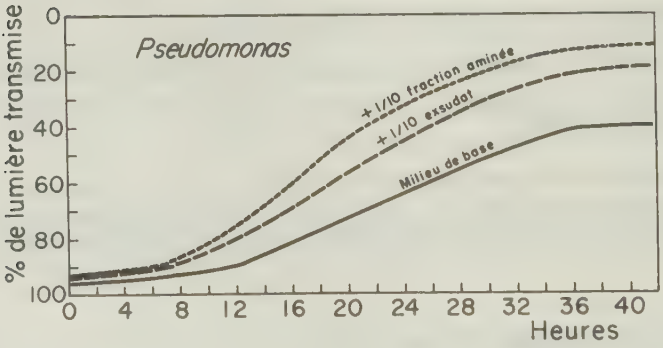



Fig. 20 : Actions sur une souche de Ps. fluorescens

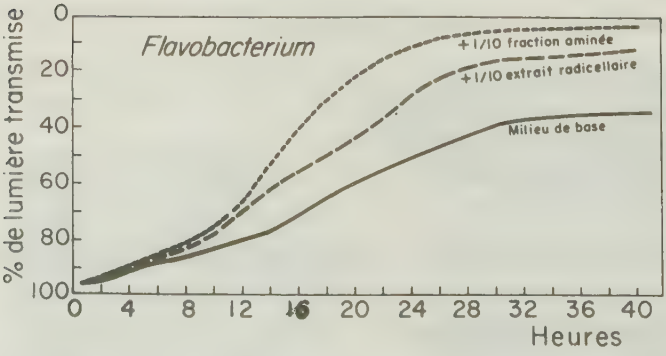



Fig. 21 : Actions sur une souche de Fl. aurantiaca

ACTIONS DE L'EXSUDAT RADICELLAIRE DE LIN
ET DE SA "FRACTION AMINEE" SUR DIVERSES BACTERIES

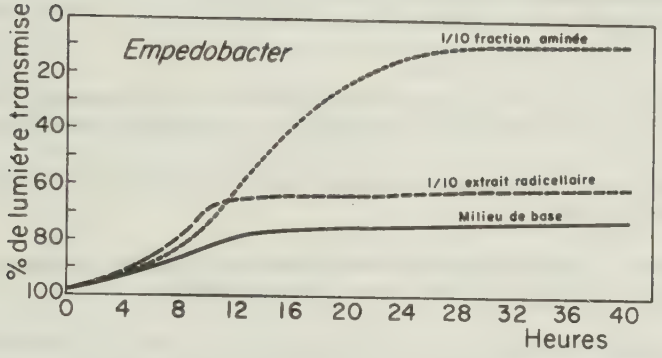



Fig. 22 : Action sur une souche de Emp. fucatum

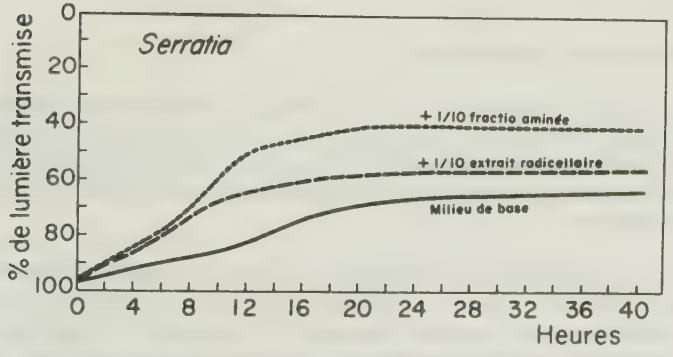



Fig. 23 : Action sur une souche de Ser. ruber

Selon les germes, la stimulation par adjonction d'extrait radicellaire est différente. Elle se manifeste surtout avec les souches de Pseudomonas et Flavobacterium, souches qui sont les plus stimulées par l'effet rhizosphère.

Si l'on considère la "fraction aminée", la stimulation est très importante. Ceci montre que les acides aminés sont une source préférentielle pour les microorganismes et l'on peut penser qu'il existe dans l'excrétion entière, des substances qui limitent la croissance.

b) Détermination de la croissance de bactéries à faible pouvoir de synthèse sous l'action d'exsudat radicellaire ou de filtrats bactériens.

25 souches de microorganismes appartenant à chacun des groupes suivants ont été testées.

Premier groupe : bactéries ne se développant pas sur un milieu minéral additionné d'azote minéral ; acides aminés nécessaires.

Deuxième groupe : bactéries ne se développant pas sur un milieu minéral additionné d'azote minéral et d'acides aminés ; facteurs de croissance nécessaires.

Après 5 jours de culture à l'étuve à 28°, la croissance se traduit par un trouble du milieu ou le plus souvent une opalescence.

Les résultats sont exprimés dans les tableaux n° XVII et XVIII.

- Interprétation et discussion.

Parmi les souches utilisées, que celles-ci exigent des acides aminés ou, en plus, des facteurs de croissance, la plupart sont capables de proliférer en présence d'exsudats. Ceci est bien en relation avec les substances décelées lors de l'analyse chimique,à savoir : acides aminés et facteurs de croissance.

Les excrétions radicellaires ne sont pas la seule source possible d'azote aminé ; nous voyons que pour la grande majorité des germes, un filtrat bactérien au moins peut éventuellement être substitué à l'exsudat radicellaire. Cependant, quelques espèces isolées des deux lots ne montrent aucune croissance aussi bien en présence d'extrait radicellaire que de filtrat bactérien.

Trois souches exigeant des amino-acides ne se développent pas en présence d'exsudat radicellaire, mais montrent une très faible croissance en présence de filtrats bactériens.

On note également que les filtrats préférentiellement utilisés sont ceux des Pseudomonas et des Bacillus, pour le groupe demandant des acides aminés.

Ceci démontre que la répartition sélective que nous avons constatée au profit des bactéries à haut pouvoir de synthèse ne peut être attribué à une toxicité des exsudats à l'égard des microorganismes à pouvoir de synthèse faible car eux aussi sont capables de se développer dans un milieu minéral additionné d'une certaine quantité d'exsudat.

D'autre part, les résultats montrent que ces mêmes bactéries peuvent également utiliser les produits de métabolisme des bactéries à pouvoir de synthèse élevé, bactéries directement influencées par les racines. Les Pseudomonas, principaux représentants, pourraient y avoir un rôle important.

Tableau XVII

ACTIONS DE L'EXSUDAT RADICELLAIRE DE LIN ET DE FILTRATS DE BACTERIES A POUVOIR DE SYNTHESE ELEVE SUR LA CROISSANCE DE GERMES NECESSITANT DES AMINO-ACIDES POUR LEUR PROLIFERATION

| Souches | Exsudats radicel. | Filtrats bactériens | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 34 | 22 | 16 | 21 | 18 | 12 | 13 | 32 | 37 | 41 | 10 |
| 1 | ++ | + | + | - | - | - | - | + | + | - | + | - |
| 2 | - | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | - |
| 3 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | - | + | - |
| 4 | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - |
| 5 | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | - | - |
| 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | + | + | ++ | + | + | - | - | - | + | - | + | + |
| 9 | + | - | - | + | + | - | - | - | + | + | - | - |
| 10 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + |
| 11 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ | + | + | + | + | - |
| 12 | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 13 | ++ | - | ++ | + | ++ | + | ++ | ++ | + | - | + | - |
| 14 | - | + | ++ | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| 15 | ++ | - | - | + | + | - | - | ++ | - | - | + | - |
| 16 | ++ | + | ++ | + | + | - | - | + | + | - | + | - |
| 17 | + | + | ++ | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 18 | + | ++ | ++ | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| 19 | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 20 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | - | - | - | + | + |
| 21 | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 22 | + | + | + | + | + | - | - | + | + | - | - | - |
| 23 | ++ | ++ | ++ | + | + | - | - | + | + | + | + | - |
| 24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 25 | + | + | + | + | + | - | - | + | + | - | - | - |

++ Croissance abondante
+ Croissance
- Pas de croissance

Tableau XVIII

ACTIONS DE L'EXSUDAT RADICELLAIRE DE LIN ET DE FILTRATS DE BACTERIES A POUVOIR DE SYNTHESE ELEVE SUR LA CROISSANCE DE GERMES NECESSITANT DES AMINO-ACIDES ET DES FACTEURS PLUS COMPLEXES POUR LEUR PROLIFERATION

| Souches | Exsudats radicel. | Filtrats bactériens | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 34 | 22 | 16 | 21 | 18 | 12 | 13 | 32 | 37 | 41 | 10 |
| 26 | ++ | + | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 27 | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 28 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 29 | + | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 30 | + | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| 31 | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 32 | + | + | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 33 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 34 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 35 | + | + | - | + | - | - | + | + | + | - | - | + |
| 36 | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | + | + |
| 37 | + | + | - | + | + | - | + | - | + | - | - | - |
| 38 | + | - | - | + | - | + | - | + | + | - | + | - |
| 39 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 40 | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| 41 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | - | + |
| 42 | + | + | - | - | - | + | + | ++ | - | - | - | + |
| 43 | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | + |
| 44 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 45 | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 46 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | - | + | ++ | - | - | + |
| 47 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 48 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 49 | + | - | ++ | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 50 | + | + | ++ | ++ | ++ | + | + | - | - | - | - | + |

++ Très bonne croissance
+ Croissance
- Aucune croissance

## CONCLUSIONS A LA TROISIEME PARTIE

Dans cette étude, nous avons pu constater que, dès les premiers stades de croissance, les racines sécrètent dans le milieu ambiant suffisamment de substances organiques variées, particulièrement des acides aminés, pour influencer la microflore présente.

L'addition d'extrait radicellaire peut, selon les souches, stimuler leur croissance (c'est le cas des germes à haut pouvoir de synthèse qui n'ont pas d'exigences nutritionnelles particulières), ou la provoquer, en apportant les composés indispensables à la prolifération de certaines bactéries.

Ces résultats prouvent que la sélection dans la rhizosphère à l'encontre des souches à faible pouvoir de synthèse, ne peut être due à un effet inhibiteur des excrétions radicellaires puisque, non seulement celles-ci ne sont pas toxiques, mais sont des sources nutritionnelles possibles pour ces souches. Il semble donc légitime d'attribuer cette sélection à la présence de souches à fort taux de croissance qui sont spécialement abondantes dans la rhizosphère.

Cette action peut à priori se concevoir de deux façons : une action toxique des produits émis par les souches à fort taux proliférateur ou bien une compétition d'ordre trophique. Nos résultats conduisent à écarter la première hypothèse, car, si les bactéries à faible taux de croissance sont dans l'impossibilité d'utiliser les substances d'excrétions, elles peuvent éventuellement utiliser les produits de métabolisme des bactéries directement stimulées par les racines. Les Pseudomonas principaux représentants pourraient y avoir un rôle important.

Ainsi, les racines de Lin agissent indirectement sur ce groupe à faible pouvoir de synthèse en favorisant la multiplication des microorganismes capables de produire au cours de leur métabolisme, les substances qui leur sont nécessaires.

# CONCLUSIONS GENERALES

Le but de cette étude a été de suivre les modifications quantitatives et qualitatives, apportées par une culture de Lin à l'équilibre écologique des microorganismes telluriques.

Nous avons tout d'abord étudié "l'effet rhizosphère" tel qu'il s'observe lors d'une culture de Lin en conditions naturelles. Deux terres bien distinctes ont été choisies, l'une ayant un pH de 7,6 et un rapport C/N de 4,8, l'autre ayant un pH de 6,6 et un rapport C/N de 10,8.

Nous nous sommes servis, après mise au point de techniques facilement reproductibles permettant d'établir un ensemble de comparaisons à quatre stades de croissance : germination, un mois après germination, floraison, flétrissement.

"L'effet rhizosphère" se traduit par une augmentation de l'activité globale de la microflore tellurique, les maxima se situant un mois après la germination et à la floraison.

Les groupes fonctionnels les plus influencés sont ceux de l'ammonification, de la dénitrification, de la protéolyse. La stimulation de chacun de ces groupements varie parallèlement à celle de l'activité globale de la microflore.

On constate également que "l'effet rhizosphère" n'est pas influencé par les caractères qui distinguent nos deux terres : le pH et le rapport C/N.

A la suite de ces résultats, nous avons pensé que le mécanisme de "l'effet rhizosphère" pouvait se limiter à deux facteurs principaux : la plante avec ses sécrétions d'une part, et la microflore tellurique d'autre part. En culture hydroponique, nous avons pu réaliser un "effet rhizosphère" dépendant uniquement du végétal et de la microflore en éliminant les facteurs liés à la structure physique et chimique du sol.

De telles conditions expérimentales permettent d'obtenir un "effet rhizosphère" que nous avons montré être très voisin de celui qui existe en conditions naturelles. Il a donc été possible d'étudier l'effet des sécrétions radicellaires sur les bactéries de la graine d'une part, les bactéries du sol d'autre part, et sur les bactéries de la graine et du sol en association.

L'étude comparative des souches bactériennes isolées à partir d'une culture hydroponique de Lin montre une action préférentielle de la part des racines, à l'égard des bactéries Gram-négatif pigmentées appartenant

essentiellement à la famille des Pseudomonadaceae du genre Pseudomonas, Flavobacterium et Empedobacter.

La culture stérile de plantules de Lin âgées de 30 jours, en milieu liquide, fait apparaître un certain nombre de composés organiques que nous avons déterminés. Ces composés ont été recherchés dans les extraits hydro-alcooliques de plantules entières et dans les liquides d'excrétion des racines. Par les méthodes chromatographiques, nous avons pu déceler, dans les deux cas, des acides aminés libres, des acides organiques fixes et volatils. Les sucres n'ont été révélés que dans les plantules entières.

Par voie biologique, plusieurs facteurs de croissance ont été mis en évidence, aussi bien dans les extraits de plantules entières que dans les excrétions radicellaires.

Toutes ces substances, facilement métabolisables, peuvent être considérées comme autant de sources nutritionnelles pour les microorganismes présents. Cependant, l'étude de la répartition des souches en fonction de leur pouvoir de synthèse a montré que, les bactéries exigeant des acides aminés et des facteurs plus complexes (que ces bactéries proviennent de la graine ou du sol), qui pourraient s'alimenter aux produits d'excrétion des racines, en sont écartées au profit de groupes à pouvoir de synthèse élevé, c'est-à-dire, n'ayant pas d'exigences nutritionnelles particulières.

Cette constatation, qui à priori, pourrait sembler paradoxale, s'explique par le fait que la plupart des souches à fort pouvoir de synthèse, isolées de la rhizosphère ou du sol témoin, ont un taux de croissance élevé, alors que celles exigeant des acides aminés ou des facteurs plus complexes prolifèrent plus lentement. Ceci permet donc, d'établir une corrélation entre pouvoir de synthèse et taux de croissance.

De plus, en comparant les taux de croissance sur le même milieu à l'extrait de sol, des bactéries de la terre témoin et de la rhizosphère, nous avons pu remarquer que la répartition des souches dans la rhizosphère ne devait pas seulement être attribuée à une stimulation de la part des substances d'excrétion du Lin (cette stimulation a d'ailleurs été mise en évidence par l'action d'extraits radicellaires sur les germes à pouvoir de synthèse élevé), mais à une sélection au profit de germes à croissance rapide et à pouvoir de synthèse élevé.

Nous avons pu vérifier que la majorité des microorganismes sont cependant capables d'utiliser les excrétions radicellaires. Ceci démontre bien que cette répartition sélective n'est pas causée par une toxicité à l'égard de certaines souches, mais par une compétition entre souches à croissance rapide et souches à croissance lente.

Nous avons vu également que les produits de métabolisme des germes à pouvoir de synthèse élevé, ceux effectivement sélectionnés par les sécrétions radicellaires, peuvent éventuellement être la source de facteurs indispensables à la prolifération d'autres groupes bactériens. Tels sont les acides aminés et les facteurs de croissance.

Nous constatons donc que les sécrétions radicellaires, tout au moins aux premiers stades de croissance, en favorisant comme il vient d'être vu, la croissance de bactéries à pouvoir de synthèse élevé, agissent indirectement sur le reste de la microflore, elle-même étroitement dépendante de l'activité de ces bactéries.

Nous pensons avoir démontré que, dès les premiers stades de croissance du Lin et dans des conditions expérimentales déterminées, la répartition quantitative et qualitative des microorganismes ne se fait pas au hasard. Elle est conditionnée, non seulement par un ensemble de facteurs définis (état de la microflore tellurique, nature des sécrétions radicellaires), mais également par un "aspect dynamique" du problème. Sans vouloir une généralisation qui serait évidemment abusive (notre étude n'ayant été faite qu'avec le Lin), il n'est cependant pas douteux que les questions de taux de croissance et de compétition nutritionnelle, jusqu'à présent peu étudiées, jouent un rôle essentiel dans l'équilibre microbien au sein de la rhizosphère.

## BIBLIOGRAPHIE

ADATI (M.), 1939. - Untersuchungen über die Rhizosphäre der Pflanzen.
J. Sci. Trop. Agr., 11, 57 (d'après RIVIERE, 1959, Thèse Paris).

ARNANDI (C.), 1961. Notizie sull' attività dell Istituto di Microbiologia generale.
Agraria e tecnica, Milan.

AUGIER (J.), 1956. A propos de la numération des Azotobacter en milieu liquide.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 91, 759.

BALICKA (N.), 1958. Activité biologique comparée des rhizosphères du Seigle et de la Vesce en culture pure ou mixte.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 95, 480.

BALICKA (N.) und KOSINKIEWICZ (B.), 1962. Die Ausnutzung einiger Stickstoffver bindungen durch Mikroorganismen der Rhizosphäre.
Zbl. Bakteriol. II Abt., 115, 737.

BARJAC (H. de) et POCHON (J.), 1953. Titrage du pouvoir ammonifiant de la microflore des sols.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 85, 82.

BARJAC (H. de) et CHALVIGNAC (M. A.), 1954. Nouvel essai sur la détermination du pouvoir amylolytique;
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 87, 85.

BAKER (J. A.) and FERGUSON (M. S.), 1942. Growth of platyfish (Platypoecilus maculatus) free from bacterial and other microorganisms.
Proc. Soc. expt. Biol. Med., U. S. A., 51, 116.

BEREZOVA (E. F.), 1946. Microflore de la rhizosphère du Lin.
Thèse, Moscou.

BHUVANESWARI (K.) and SUBBA-RAO (N. S.), 1957. Root exsudates in relation to the rhizosphere effect.
Proc. Indian. Acad. Sci., 45, 299.

BOND (G.) and BOYES (J.), 1939. Nitrogenous excretion from root nodules.
Nature, 144, 946.

BÖRNER (H.), 1960. Liberation of organic substances from higher plants and their rôle in the soil sickness problem.
Bot. Rev., 26, 393.

BORNER (H.) and RODEMACHER (L.), 1957. Untersuchungen um Problem der echten Selbstunverträglichkeit des Leins.
Zeits. Pflanz., 76, 123.

BRISBANE (P. G. ) and ROVIRA (A. D. ), 1961. A comparaison of methods for classifying rhizosphere bacteria.
J. Gen. Microbiol., 26, 379.

BRISOU (J. ), 1958. Etude de quelques Pseudomonadaceae.
Thèse de Sciences, Paris.

BUKATSCH (F. ), BURGER (K. ) und SCHLÜTTER (M. ), 1956. Untersuchungen über Eiweisse und Eiweisstoffwechsel bei Azotobacter mit besonderer Berücksichtung der Indolkörper.
Zbl. Bakteriol. Abs., II, 109, 226.

BURTON (M. O. ) and LOCHHEAD (A. G. ), 1951. Studies on the production of vitamin $B_{12}$ active substances by microorganisms.
Can. J. Boc., 29, 352.

CARE (M. ), 1959. Contribution à l'étude des substances excrétées par les racines des végétaux supérieurs.
Thèse, Lille.

CHALVIGNAC (M. A. ), 1960. Sur les difficultés rencontrées dans la caractérisation des souches bactériennes telluriques.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 99, 459.

CHALVIGNAC (M. A. ), 1962. Incidence des Azotobacter sur la nutrition et la croissance du Lin.
Agrochemica, 6, 286.

CHAN (E. C. S. ), 1963. The influence of soil and root extracts on the associative growth of selected soil bacteria.
Can. J. Microbiol., 9, 2, 187.

CHAN (E. C. S. ), KATZNELSON ( H. ), ROUATT (V. W. ), 1963. The influence of soil and root extracts on the associative growth of selected soil bacteria.
Can. J. Microbiol., 9, 187.

CHESTER (F. D. ), 1900. Studies in systematic bacteriology.
Del Agr. Exp. Sta. Rept., 11, 34.

CHOUARD (P. ), 1952. Culture sans sol.
La Maison Rustique, ed., Paris.

CHOLODNY (N. ), 1930. Ueber eine neue Methode zur Untersuchung der Bodenmikroflora.
Arch. Mikrobiol., 1, 620.

CLARK (F. E. ), 1939. Effects of soil amendments upon the bacterial populations associated with roots of wheat.
Trans. Kansas Acad. Sci., 42, 91.

CLARK (F. E. ), 1940. Notes on types of bacteria associated with plant roots.
Trans. Kansas Acad. Sci., 43, 75.

CLARK (F. E. ), 1949. Soil microorganisms and plant roots.
Adv. Agron. , U. S. A., 1, 241.

COCHRAN (W. G. ), 1938. Some difficulties in the statistical analysis of replicated experiments.
Emp. Exper. Agric., 6, 157.

COMBES (R. ), 1917. Biochemical investigations on the physiological rôle of glucosides in plants.
Rev. gen. Bot., 29, 321-50, 353.

CONTOIS (D. E. ), 1953. Microflora of the rhizosphere of the pinneaple plant.
Soil. Sci., 76, 259.

COOK (F. D. ) and LOCHHEAD (A. G. ), 1959. Growth factor relationships of soil microorganisms as affected by proximity to the plant root.
Can. J. Microbiol., 5, 323.

COPPIER (O. ) et BARJAC (H. de), 1952. De la richesse d'un sol en micro-organismes nitrificateurs.
Ann. Inst. Pasteur, 83, 118.

Mc CRADY (M. H. ), 1918. Tables for rapid interpretation of fermentation tube results.
Can. Pub. Health J., 9, 201.

CRANNER ( B. H. ). Zur Biochemie und Physiologieder Grenzschichten lebender Pflanzenzellen.
Meld. Norges Landbr., 5, 1.

CREUZBURG (U. ), 1928. Untersuchungen über den Einfluss des Pflanzenbestandes auf das Bakterienleben im Boden.
Landwirtsch. Jahr., 68, 75. (d'après RIVIERE, 1959, Thèse, Paris).

DASTE (P. ), 1950. L'effet rhizosphère chez le Triticum sphaerococcum.
Rev. Gen. Bot., 57, 685.

DASTE (P. ), 1958. Recherches sur l'écologie bactérienne dans la rhizosphère de quelques plantes supérieures.
Rev. Cytol. Biol. Vég., XIX, 1.

DASTE (P. ) et HELLER (R. ), 1951. La formation des silico-gels. Etude critique et application en microbiologie.
Rev. Gén. Bot., 58, 393.

DEDONDER (R. ), 1952. Les glucides du Topinambour. I. Mise en évidence d'une série de gluco-fructoses dans les tubercules du Topinambour. Isolement, analyse et structure des termes les moins polymérisés.
Bull. Soc. Chim. Biol., 34, 144.

DEMETER (K. ), MOSSEL (H. ), 1933. Über die Brauschbarkeit von Cholodnys mikrokopischen"Aufwuchsplattenmethode" bei mikrobiologischen Boden-Untersuchungen.
Zbl. Bakteriol. II, 88, 384.

DUCHAUFOUR (P. ), 1960. Précis de Pédologie.
Masson Edit. , Paris.

EBERHARDT (F.), 1955. Über fluoreszierende Verbindungen in der Wurzel des Hafers. Ein Beitrag zum Problem der Wurzelausscheidungen.
Z. Bot. Dtsch., 43, 405.

FARREN Mc (F. E.), 1951. Buffered filter paper chromatography of the amino acids.
Anal. Chem., 23, 168.

FEDOROV (M. V.), 1951. Travaux pratiques de Microbiologie (en russe) (d'après RIVIERE).
Thèse, Moscou.

FEDEROV (M. V.) and TEPPER (E. Z.), 1947. Factors influencing the survival of Azotobacter in the rhizosphere of cultural plants and in soil.
Mikrobiologiya S. S. S. R., 16, 498.

FEDOROV (M. V.) et NEPOMILOVEV (V. P.), 1954. Multiplication et activité azoto-fixatrice dans la rhizosphère des herbes vivaces (en russe).
Mikrobiologiya, 23, 275.

FRED (E. B.), HAAS (A. R. C.), 1919. The etching of marble by roots in the presence and absence of bacteria.
J. Gen. Physiol., 1, 631.

FRIES (N.) and FORSMAN (B.), 1951. Quantitative determination of certain nucleic acid derivatives in pea root exsudate.
Physiol. Plant., 4, 410.

GERICKE (W. F.) and TAVERNETTI (J. R.), 1936. Heating of liquids cultures media for tomato production.
Agr. Eng., 17, 141.

GERRETSEN (F. C.), 1935. Das Katadyn-Verfahren zur sterilen Kultur höheren Pflanzen.
Planta, 23, 593.

GERRETSEN (F. C.), 1948. The influence of microorganisms on the phosphate intake by plants.
Plant and Soil, 1, 51.

GOLEBIOWSKA (J.), KOBUS (J.), MALISZEWSKA (W.), PACEWICZ (T.), SOBIESZCZANSKI (J.) et STRZEMSKA (J.). L'influence du mode de prélèvement et de conservation des échantillons du sol sur son état microbiologique.
Symposium, Paris, 1957.

GORING (C. A. I.) and CLARK (F. E.), 1949. Influence of crop growth on mineralization of nitrogen in the soil.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 13, 261.

GRAF (G.), 1930. Über den Einfluss des Pflanzenwachstums auf die Bakterien im Wurzelbereich.
Zbl. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II, 82, 44.

GREAVES (J. E.), 1918. Azotification.
Soil Sci., 6, 163.

GYLLENBERG (H. G.), 1955. The rhizosphere effect of gramineaceous plants in virgin soils. Physiol. Plant., 8, 644.

HARMSEN (G. W.) and van SCHREVEN (D. A.), 1955. Mineralization of organic nitrogen in soil.
Adv. Agr., 7, 299.

HARPER (J. L.), 1950. Studies in the resistance of certain varieties of banana to Panama disease.
Plant and Soil, 3, 374-82, 383.

HILDEBRAND (A. A.) and WEST (P. M.), 1941. Strawberry root-rot in relation to microbiological changes induced in root-rot soil by the incorporation of certain cover crops.
Can. J. Research, C, 19, 183.

HILTNER (L.), 1904. Ueber neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache.
Arb. Deut. Landw. Ges., 98, 59.

HOFFMAN (C.), 1914. A contribution to subject of the factors concerned in soil productivity.
Univ. Kansas Sci. Bull., 9, 81.

HOLDING (A. J.), 1960. The properties and classification of the predominant gram-negative bacteries occuring in soil.
J. Appl. Bacteriol., 23, 3, 515.

HOMES (M. V.), 1963. La solution de culture "hydroponique".
Agrochimica Ital., 7, 2, 101.

HULPOI (N.), 1936. Demonstration von Mikroorganismen der Rhizosphäre vermittels der Aufwuchsplattenmethode nach Cholodny.
Arch. Mikrobiol. Dtsch., 7, 579.

IVARSON (K. C.) and KATZNELSON (H.), 1960. Studies on the rhizosphere microflora of yellow Birch seedlings.
Plant and Soil, 12, 1, 30.

JONES (L. W.) and GREAVES (J. E.), 1943. Azotobacter chroococcum and its relationship to accessory growth factors.
Soil Sci., 55, 393.

JENSEN (H. L.), 1933. Corynebacteria as an important group of soil micro-organisms.
Proc. Linn. Soc. New S. Wales, 58, 181.

KAISER (P.), 1961. Etude de l'activité pectinolytique du sol et d'autres substrats naturels.
Thèse, Paris.

KANDLER (O.), 1951. Papierchromatographischer Nachweis der Aminosäureausscheidung in vitro Kultivierter Maiswurzeln.
Z. Naturforsch., 66, 437.

KATZNELSON (H.), 1946. The rhizosphere effect of mangels on certain groups of micro-organisms.
Soil Sci., 62, 343.

KATZNELSON (H.) and RICHARDSON (L. T.), 1943. The microflora of the rhizosphere of tomato plants in relation to soil sterilization.
Can. J. Research, C, 21, 249.

KATZNELSON (H.), LOCHHEAD (A. G.) and TIMONIN (M. I.), 1948. Soil microorganisms and the rhizosphere.
Bot. Rev., 14, 543.

KATZNELSON (H.), ROUATT (J. W.) and PAYNE (T. M. B.), 1955. Liberation of aminoacids and reducing compounds by plant roots.
Plant and Soil, 7, 35.

KATZNELSON (H.), ROUATT (J. W.) and PAYNE (T. M. B.), 1956. Recent studies on the microflora of the rhizosphere.
Rapp. VIe Cong. Intern. Sci. Sol, Paris, 3, 151.

KATZNELSON (H.) and ROUATT (J. W.), 1957. Studies on the incidence of certain physiological groups of bacteria in the rhizosphere.
Can. J. Microbiol., 3, 2, 265.

KATZNELSON (H.) and STREZELCZYK (E.), 1961. Studies on the interaction of plants and free-living nitrogen-fixing microorganism. I. Occurence of Azotobacter in the rhizosphere of crop plants.
Can. J. Microbiol., 7, 437.

KAUFFMANN (J.) et BOQUET (G.), 1951. Nouvelle méthode de détermination du pouvoir nitrificateur d'une terre.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 81, 667.

KING (H. de L.) and WALLACE (R. H.), 1956. Morphological and physiological groups of soil bacteria from the roots of barley and oats.
Can. J. Microbiol., 2, 473.

KRASSILNIKOV (N. A.), 1934. Influence of root secretion on the development of Azotobacter and other soil microbes.
Microbiologiya, S. S. S. R., 3, 343.

KRASSILNIKOV (N. A.), 1944. Microflore du sol et influence des plantes.
Microbiologiya, 13, 187.

KRASSILNIKOV (N. A.), 1954. Antagonismes microbiens et substances antibiotiques comme facteurs de résistance des plantes aux infections (en russe).
Dokl. Akad. Nauk. S. S. S. R., 94, 1177.

KRASSILNIKOV (N. A.), 1955. Assimilation of Microbial Metabolites by the plants roots.
S. S. S. R. Acad. Sci., 110, 5.

KRASSILNIKOV (N. A.), 1958. Soil microorganisms and higher plants.
Izvest. Acad. Sci. S. S. S. R., Moscou.

KRASSILNIKOV (N. A.), 1961. On the role of soil bacteria in plant nutrition.
Appl. Microbiol., 7, 2, 128.

KRASSILNIKOV (N. A.), KRISS (A. E.) and LITVINOV (M. A.), 1936. The microbiological characteristic of the rhizosphere of cultural plants (en russe)
Microbiologiya, 5, 87.

LAJUDIE (J.) et CHALVIGNAC (M. A.), 1956. Appréciation de l'activité protéolytique de la microflore du sol.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 90, 359.

LINFORD (M. B.), 1942. Methods of observing soil flora and fauna associated with roots.
Soil Sci., 53, 93.

LOCHHEAD (A. G.), 1940. Qualitative studies of soil microorganism. III. Influence of plant growth on the character of the bacterial flora.
Can. J. Research, C, 18, 42.

LOCHHEAD (A. G.), 1948. Chromogenic bacteria related to Bacterium globiforme.
J. Bacteriol., 55, 579.

LOCHHEAD (A. G.), 1952. Soil Microbiology.
Ann. Rev. Microbiol., 6, 185.

LOCHHEAD (A. G.), 1958. Qualitative studies of soil microorganisms.
Can. Depart. Agri. Ottawa.

LOCHHEAD (A. G.), TIMONIN (M. I.) and WEST (P. M.), 1940. The microflora of the rhizosphere in relation to resistance of plants to soil borne pathogens.
Sci. Agr., 20, 414.

LOCHHEAD (A. G.) and CHASE (F. E.), 1943. Qualitative studies of soil microorganisms. V. Nutritional requirements of the predominant bacterial flora.
Soil Sci., 55, 185.

LOCHHEAD (A. G.) and THEXTON (R. H.), 1947. Qualitative studies of soil microorganisms. VII. The rhizosphere effect in relation to the amino acid nutrition of bacteria.
Can. J. Research, C, 25, 20.

LOCHHEAD (A. G.) and BURTON (M. O.), 1953. An essential bacterial growth factor produced by microbial synthesis.
Can. J. Bot., 31, 7.

LOCHHEAD (A. G.) ang BURTON (M. O.), 1956. Importance of soil extract for the enumeration and study of soil bacteria.
Rapp. VIe Congr. Intern. Sci., Paris, 3, 157.

LOCHHEAD (A. G.) and BURTON (M. O.), 1957. Qualitative studies of soil microorganisms. XIV. Specific vitamin requirements of the predominant bacterial flora.
Can. J. Microbiol., 3, 35.

LÖHNIS (F.), 1926. Effect of growing legumes upon succeeding crops.
Soil Sci., 22, 355.

LUNEGARD (H.) and STENLID (G.), 1944. On the exsudation of nucleotides and flavanone from living roots.
Ark. Bot., 31, 1.

LYON (T. L.) and WILSON (P. K.), 1921. Liberation of organic matter by roots of growing plants.
N. Y. Agr. Expt. Sta. Mem., 40, 1 d'après RIVIERE, Thèse, Paris).

LYON (T. L.), BIZZELL (J. A.) and WILSON (B. D.), 1923. Depressive influence of certain higher plants on the accumulation of nitrates in soil.
J. Am. Soc. Agron., 15, 457.

MAASSEN (A.), 1901. A contribution to soil Bacteriology.
Arb. K. Gesundheitsant, 18, 21(d'après J.POCHON,Traité microbiologie des sols,p. 166).

MACURA (J.), 1958. The rhizosphere microflora of sugar beet.
Folia biol., 3, 129.

MASE (P.), 1911. Sur l'excrétion des substances minérales et organiques par les racines et les stomates aquifères.
C. R. Acad. Sci., 152, 452.

MESHKOV (N. V.), 1952. Facteurs de croissance pour les microorganismes dans les sécrétions radicellaires des plantes (en russe).
Zh. Obshcher Biol., S. S. S. R., 13, 76.

MESHKOV (N. V.) and KHODOKOVA (R. N.), 1954. Action des excrétions radicellaires du Pois et du Maïs sur la croissance de quelques micro-organismes du sol cultivés en solution rhizosphère (en russe).
Microbiologiya, 23, 544.

METZ (H.), 1955. Untersuchungen über die Rhizosphäre.
Arch. Mikrobiol., 23, 297.

MICHOUSTIN (E. N.), 1957. La numération des bactéries du sol pour la détermination du type et de l'état du sol.
Symp. Etud. Microb. Sol, Paris.

MININA (E. G.), 1927. The acidity of root secretion.
Bull. inst. recherches biol. Univ., 5, 233.
Chem. Abs. XXII, 2, 2388, 1928.

NILSSON (P. E.), 1957. Influence of crop on biological activities in soil.
Kgl. Landbohojsk ARSSKR, 23, 175 ( d'après RIVIERE, 1959, Thèse, Paris).

OSTEUX (R.), GUILLAUME (J.) et LATURAZE (J.), 1958. Séparation des acides aliphatiques volatils par chromatographie sur papier.
J. Chromatogr., 1, 70.

PANTOS (G.), 1956. The effect on wheat of the bacteria of its rhizosphere under monobacterial conditions.
Agrokem. Talajtan Magyar, 5, 3, 351.

PANTOS (G.), 1956. Qualités physiologiques des espèces de Bactéries dominant dans la rhizosphère du Blé pendant les différentes périodes de développement de la plante et leur effet sur la plante.
Rapp. VIe Cong. Intern. Sci. Sol, Paris, 3, 237.

PARKINSON (D.), 1955. Liberation of amino-acids by oat seedlings.
Nature, 176, 4470.

PAYNE (T. M. B.), ROUATT (J. W.) and LOCHHEAD (A. G.), 1957. The relationship between soil bacteria with simple nutritional requirements and those requiring amino-acids.
Can. J. Microbiol., 3, 73.

PICCI (G.), 1959. Dosaggio microbiologico di alcane vitamine e di alcuni aminoacidi ceduti dal seme durante la germinazione.
Ann. Fac. Agr. Pisa, 20, 51.

POCHON (J.), 1954. Manuel technique d'analyse microbiologique du sol.
Masson édit., Paris.

POCHON (J.) et TCHAN (Y. T.), 1948. Précis de microbiologie du sol.
Masson édit., Paris.

POCHON (J.) et BARJAC (H. de), 1956. Recherches sur la rhizosphère du Maïs. Action des fumures minérales et organiques.
Rapp. VIe Cong. Intern. Sci. Sol, Paris, 3, 287.

POCHON (J.) et BARJAC (H. de), 1958. Interactions entre la croissance des Azotobacter et celle du Maïs.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 94, 419.

POCHON (J.) et TARDIEUX (P.), 1962. Techniques d'analyses en microbiologie du sol.
Coll. "Techniques de base", Paris.

PREVOT (A. R.), 1961. Traité de systématique bactérienne.
Dunod éd., Paris.

RAMBELLI (A.), 1959. Qualche indagin sulla microbiologia dei terreni coltivati ad eucalitto.
"Publicazioni" III, 217.

REED (H. J.), MUENCH (H.), 1938. A simple method of estimating fifty for cent endpoint.
Amer. J. Hyg., 27, 493.

REUSZER (H. W.), 1962. Axenic techniques in the determination of root functions and the interrelationships of microorganisms and plant roots.
Soil Sci., 93, 1, 56.

RIVIERE (J.), 1959. Contribution à l'étude de la rhizosphère du Blé.
Thèse, Paris.

RIVIERE (J.), 1961. Action des microorganismes de la rhizosphère de la croissance du Blé. I. Répartition des germes et des groupes nutritionnels.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 101, 611.

ROSSI (G.), RICCARDO (S.), GESVÈ (G.), STANGANELLI (M.) and WANG (T.K.), 1936. Direct microscopic and bacteriological examination of the soil. Soil Sci., 41, 53.

ROUATT (J.W.), 1959. Initiation of the rhizosphere effect. Can. J. Microbiol., 5, 67.

ROUATT (J.W.) and KATZNELSON (H.), 1957. The comparative growth of bacterial isolates from rhizosphere and non rhizosphere soils. Can. J. Microbiol., 3, 271.

ROUATT (J.W.) and KATZNELSON (H.), 1961. A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere soil of crop plants. J. appl. Bacteriol., 24, 2, 164.

ROVIRA (A.D.), 1956. Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. II. A study of the properties of root exudate and its effect on the growth of microorganisms isolated from the rhizosphere and control soil. Plant and Soil, 7, 195.

ROVIRA (A.D.), 1956. A study of the development of the root surface microflora during the initial stages of plant growth. J. Appl. Bacteriol., 19, 72.

ROVIRA (A.D.), 1956. Plant root excretion in relation to the rhizosphere effect. III. The effect of root exudate on the numbers and activity of microorganisms in soil. Plant and Soil, 7, 209.

ROVIRA (A.D.), 1959. Root excretion in relation to the rhizosphere effect. IV. Influence of plant species, age of plant, light, temperature, and calcium nutrition on exudation. Plant and Soil, 11, 53.

ROVIRA (A.D.), 1962. Plant root exudates in relation to the rhizosphere microflora. Soil and Fert XXX, 167.

ROVIRA (A.D.) and HARRIS (J.R.), 1961. Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. V. The exsudation of the groupe vitamines. Plant and Soil, 14, 199.

ROVIRA (A.D.) and STERN (W.R.), 1961. The rhizosphere bacteria in grass-clover associations. Austral. J. Agric. Res., 12, 6, 1108.

RUSSEL (A.L.), 1892. Bacteria in their relation to vegetable tissue. Dissertation Baltimore (d'après STARKEY, 1958, Bacteriol. Rev., 22, 154).

RUSCHEL (A.P.) and DOBEREINER (J.), 1961. Equilibrio microbiano na rizosfera de Arnoz, Feijao e Milho. Cent. Nat. Ensi. Proq. Agra., 14.

SANFORD (G.B.), 1948. The occurence of bacteria in normal potato plants and legumes. Sci. Agr., 28, 21.

SCHULOW (I.), 1911. Zur Methodik steriler kulturen höheren Pflanzen.
Ber. dtsch. bot. Gesellsch., 29, 504.

SCHOPFER (W. H.), 1935. Les vitamines cristallisées $B_1$ comme hormones de croissance chez un microorganisme (Phycomyces).
Arch. Mikrobiol., 6, 139.

SCHROTH (M. N.) and SNYDER (W. C.), 1961. Effect of host exudates on chlamydos from germination of the bears root rot fungus, Fusarium solari, Fusarium phaseoli.
Phytopathol., 51, 389.

SKERMAN (V. B. O.), 1959. A guide to the identification of the genera of bacteria.
Williams Wilkins company, Baltimore, 2.

SPERBER (J.) and ROVIRA (A. D.), 1959. A study of the bacteria associated with the roots of subterraneum clover.
J. Appl. Bacteriol., 22, 1, 85.

STARKEY (R. L.), 1929. Some influences of the development of higher plants upon the microorganisms in the soil. II. Influence of the stage of plant growth upon abondance of organisms.
Soil Sci., 27, 355.

STARKEY (R. L.), 1931. Idem. IV. Influence of proximity to roots on abondance and activity of microorganisms.
Soil Sci., 32, 367.

STARKEY (R. L.), 1938. Some influences of the development of higher plants upon the microorganisms in the soil. VI. Microscopic examination of the rhizosphere.
Soil Sci., 45, 207.

STARKEY (R. L.), 1939. The influence of plants upon the soil population.
Proc. 3rd Int. Congr. Microbiol., New-York, 304.

STARKEY (R. L.), 1955. Relations of micronutrients to development of microorganisms.
Soil Sci., 79, 1.

STARKEY (R. L.), 1958. Interrelations between microorganisms and plant roots in the rhizosphere.
Bacteriol. Rev., 22, 154.

STERMAN (R. L.), 1955. Statistical concepts in Microbiology.
Bacter. Rev., 19, 160.

STEVENSON (I. L.) and ROUATT (J. W.), 1953. Qualitative studies of soil microorganisms. XI. Further observations on the nutritional classification of bacteria.
Canad. J. Bot., 31, 438.

STILLE (B.), 1938. Untersuchungen über die Bedeutung der Rhizosphäre.
Arch. Mikrobiol., 9, 477.

STOLP (H.), 1952. Beiträge zur Frage der Bezielhungen zwishen mikroorganismen und höherein Pflanzen.
Arch. Mikrobiol., 17, 1

TOTZKY (G.), CULBRETH (W.) and MISH (L. B.), 1961. An apparatus for growing intact plants with aseptic roots.
Am. Inst. Biol. Sci. Bull., 11, 71.

TREZELCZYK (E.), 1961. Studies on the incidence of certain "nutritional" and physiological group of bacteria in rhizosphere and non rhizosphere soil.
Acta Microbiol. Polon., 10, 169.

ARDIEUX (P.), CHALVIGNAC (M. A.), CHARPENTIER (M.), TARDIEUX (A.), POCHON (J.) 1961. Interactions microorganismes-maïs en culture hydroponique aux premiers stades de croissance.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 100, 243.

AYLOR (C. B.) et LOCHHEAD (A. G.), 1938. Qualitative studies of soil microorganisms. II. A survey of the bacterial flora of soils differing in fertility.
Can. J. Research, C, 16, 162.

AYLOR (C. B.), 1951. The nutritional requirements of the predominant bacterial flora of the soil.
Proc. Soc. Applic. Bact., 14, 101.

CHAN (Y. T.), 1952. Note on the estimation of Azotobacter in the soil.
Proc. Linn. Soc. New S. Wales, 77, 89.

EPPER (E. S. Z.), 1944. Méthode de détermination des bactéries typiques dans la rhizosphère des plantes cultivées (en russe).
Trudy S. Z. H. A., 2, 131.

RVET (I. W.) and HOLLIS (J. P.), 1948. Bacteria in the storage organs of healthy plants.
Phytopathology, 38, 960.

HOM (C.) and HUMFIELD (H.), 1932. Notes on the associations of microorganisms and roots.
Soil Sci., 34, 29.

MONIN (M. I.), 1939. The interaction of higher plants and soil microorganisms.
Thesis. Rutgers Univ.

MONIN (M. I.), 1940. The interaction of higher plants and soil microorganisms. I. Microbial population of rhizosphere of seedlings of certain cultivated plants.
Can. J. Research, C, 18, 307.

MONIN (M. I.), 1940. The interaction of higher plants and soil microorganisms. II. Study of the microbial population of the rhizosphere in relation to resistance of plants to soil-borne diseases.
Can. J. Research, B, 18, 444.

MONIN (M. I.) and THEXTON (R. H.), 1950. The rhizosphere effect of onion and garlic on soil microflore.
Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 15, 186.

PPING (L. E.), 1937. The predominant microorganisms in soils. I. Description and classification of the organisms.
Zbl. Bakteriol. Abst. II, 97, 289.

VAGNEROVA (K.), CATSKA (V.) and MACURA (J.), 1960. Composition and properties of bacterial and fungal flora of wheat rhizosphere.
7th int. Cong. Soil Sci., Madison.

VAGNEROVA (K.) and VANCURA (V.), 1962. Production and utilisation of aminoacids by various species of Rhizosphere Bacteria.
Fol. Microbiol., 7, 55.

VANCURA (V.), MACURA (J.), 1959. The development of Azotobacter in the oat rhizosphere and its effect on the yield.
Fol. microbiol., 4, 200.

VANCURA (V.) and MACURA (J.), 1960. Indole derivates in Azotobacter cultures.
Fol. microbiol., 5, 293.

VANCURA (V.) and MACURA (J.), 1961. Effect of root excretion on Azotobacter.
Fol. microbiol., 6, 250.

VERONA (O.), 1958. La "spermosphère".
Ann. Inst. Pasteur, Paris, 95, 795.

VERONA (O.), 1958. Influenza della sostanze mucillaggino e presenti nella porte esterna di alcuni semi sulla spermosfera.
An. Facol. Agr., Italie, XIX.

VIRTANEN (A. I.) and LAINÈ (T.), 1939. Chemical nature of the amino-acids excreted by leguminous root nodules.
Biochem. J., 33, 412.

WAKSMANN (J. A.), 1932. Principles of soil Microbiology.
Williams and Wilkins ed., Baltimore.

WALLACE (R. H.) and LOCHHEAD (A. G.), 1949. Qualitative studies of soil microorganisms. VIII. Influence of various crop plants on the nutritional groups of soil bacteria.
Soil Sci., 67, 63.

WALLACE (R. H.) and LOCHHEAD (A. G.), 1950. Qualitative studies of soil microorganisms. IX. Amino-acid requirements of thizosphere bacteria.
Can. J. Research, C, 28, 1.

WALLACE (R. H.) and LOCHHEAD (A. G.), 1951. Bacteria associated with seeds of various crop plants.
Soil Sci., 71, 159.

WEBLEY (D. M.), EASTWOOD (D. J.) and GIMINGHAM (C. H.), 1952. Development of a soil microflora in relation to plant succession on sand dunes, including the rhizosphere flora associated with colonizing species.
J. Ecol., 40, 168.

WEST (P. M.), 1939. Excretion of biotine and thiamine by roots of higher plants.
Nature, 144, 1050.

' (P. M. ) and LOCHHEAD (A. G. ), 1940. Thenutritional requirements of soil bacteria.
basis for determining bacterial equilibrum of soils.
il Sci., 50, 409.

' (P. M. ) and LOCHHEAD (A. G. ), 1940. Qualitative studies of microorganisms. IV. The
izosphere in relation to the nutritive requirements of soil bacteria.
n. J. Research, C, 18, 129.

ON (B. D. ) and WILSON (J. K. ), 1925. Explanation for the relative effects of timothy and
ver residues in the soil on nitrate depression.
Y. Agr. Expt., Sta. Mem., 95,d'après RIVIERE, 1959, Thèse, Paris).

GRADSKY (S. ), 1925. Etudes sur la microbiologie du sol. I. Sur la méthode.
n. Inst. Pasteur, Paris, 39, 299.

GRADSKY (S. ), 1929. Etudes sur la microbiologie du sol. IV. Sur la dégradation de la
lulose dans le sol.
n. Inst. Pasteur, Paris, 43, 549.

ER (A. G. ), 1952. Humus und Pflanze. Die wechselwirkung von Pflanze und Boden in
hte neuester Forschungen.
t. Bot., Dtsch., 40, 153.

LLO (A. C. ) and KATZNELSON (H. ), 1957. Metabolic activity of bacterial isolates
n wheat rhizosphere and control soil.
Bacteriol., 73, 760.

VSKAYA (P. W. ), 1941. Changements dans la bactériorhize des plantes cultivées (en
se).
robiologiya, 10,1919.

**DEUXIÈME THÈSE**

## Propositions données par la Faculté

# LA BACTERISATION DES GRAINES

Vu et approuvé :

*Paris, le* 8 Avril 1965 *19*

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie
de Paris,

Jean ROCHE